



Universidad Nacional Mayor de San Marcos

Universidad del Perú. Decana de América

Dirección General de Estudios de Posgrado

Facultad de Medicina

Unidad de Posgrado

**Evaluación de la capacidad antioxidante y efecto
hepatoprotector del zumo del fruto corryocactus
brevistylus, en ratas con intoxicación por paracetamol**

TESIS

Para optar el Grado Académico de Doctor en Ciencias de la Salud

AUTOR

Oscar Gustavo HUAMÁN GUTIÉRREZ

ASESOR

Dra. María Mercedes SOBERÓN LOZANO

Lima, Perú

2019



Reconocimiento - No Comercial - Compartir Igual - Sin restricciones adicionales

<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/>

Usted puede distribuir, remezclar, retocar, y crear a partir del documento original de modo no comercial, siempre y cuando se dé crédito al autor del documento y se licencien las nuevas creaciones bajo las mismas condiciones. No se permite aplicar términos legales o medidas tecnológicas que restrinjan legalmente a otros a hacer cualquier cosa que permita esta licencia.

Referencia bibliográfica

Huamán, O. Evaluación de la capacidad antioxidante y efecto hepatoprotector del zumo del fruto *corryocactus brevistylus*, en ratas con intoxicación por paracetamol [Tesis doctoral]. Lima: Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Facultad de Medicina, Unidad de Posgrado; 2019.

Hoja de metadatos complementarios

CÓDIGO ORCID DEL AUTOR: 0000-0002-6224-9165

CÓDIGO ORCID DEL ASESOR: 0000-0001-5063-1407

DNI DEL AUTOR: 10454580

GRUPO DE INVESTIGACIÓN:

BBIOQUIMICA Y NUTRICION (GIBN)

INSTITUCIÓN QUE FINANCIA PARCIAL O TOTALMENTE LA INVESTIGACIÓN:

VICERRECTORADO DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO

UBICACIÓN GEOGRÁFICA DONDE SE DESARROLLÓ LA INVESTIGACIÓN, DEBE INCLUIR LOCALIDADES Y COORDENADAS GEOGRÁFICAS:

FACULTAD DE MEDICINA: CENTRO DE INVESTIGACIÓN DE BIOQUÍMICA Y NUTRICIÓN

12° 03' 28'' S Y 77° 01' 23'' O

AÑO O RANGO DE AÑOS QUE LA INVESTIGACIÓN ABARCÓ:

2014 – 2018 (4 AÑOS)



Universidad Nacional Mayor De San Marcos
Universidad del Perú, DECANA DE AMÉRICA
FACULTAD DE MEDICINA
VICEDECANATO DE INVESTIGACIÓN DE POSGRADO
SECCIÓN DOCTORAL



ACTA DE SUSTENTACIÓN DE TESIS PARA OPTAR EL GRADO DE DOCTOR

En la ciudad de Lima, a los doce días del mes de julio del año dos mil diecinueve siendo las **2.00 pm**, ante el Jurado de Sustentación, bajo la Presidencia de la **Dra. DORIS VIRGINIA HUERTA CANALES**, y los Miembros del mismo, los Doctores:

DRA. DORIS VIRGINIA HUERTA CANALES	PRESIDENTE
DRA. LUZMILA VICTORIA TRONCOSO CORZO	MIEMBRO
DR. ARROYO ACEVEDO, JORGE LUÍS	MIEMBRO
DR. MIGUEL HERNÁN SANDOVAL VEGAS	MIEMBRO
DRA. MARIA MERCEDES SOBERON LOZANO	ASESORA

El postulante al Grado de Doctor en Ciencias de la Salud, es Magister en Bioquímica, don: **HUAMÁN GUTIÉRREZ OSCAR GUSTAVO** procedió a hacer la exposición y defensa pública de su Tesis titulada: **"EVALUACIÓN DE LA CAPACIDAD ANTIOXIDANTE Y EFECTO HEPATOPROTECTOR DEL ZUMO DEL FRUTO CORRYOACTUS BREVISTYLUS, EN RATAS CON INTOXICACIÓN POR PARACETAMOL"**, para optar el grado Académico de Doctor.

Concluida la exposición, se procedió a la evaluación correspondiente, después de la cual obtuvo la siguiente calificación **"A" EXCELENTE 19 (DIECINUEVE)** a continuación, el Presidente del Jurado recomienda que la Facultad de Medicina, proponga que se le otorgue al Magister: **HUAMÁN GUTIÉRREZ OSCAR GUSTAVO**, el Grado Académico de Doctor en **CIENCIAS DE LA SALUD**.

Se expide la presente Acta en seis originales y siendo las 3:40 pm. se da por concluido el acto académico de sustentación.


DRA. LUZMILA VICTORIA TRONCOSO CORZO
MIEMBRO DEL JURADO DE SUSTENTACIÓN


DR. ARROYO ACEVEDO, JORGE LUÍS
MIEMBRO DEL JURADO DE SUSTENTACIÓN


DR. MIGUEL HERNÁN SANDOVAL VEGAS
MIEMBRO DEL JURADO DE SUSTENTACIÓN


DRA. MARIA MERCEDES SOBERON LOZANO
ASESOR DEL TESISISTA


DRA. DORIS VIRGINIA HUERTA CANALES
PRESIDENTE DEL JURADO DE SUSTENTACIÓN

ÍNDICE GENERAL

Dedicatoria	
Agradecimiento	
Resumen	
Abstract	
LISTA DE ABREVIATURAS	
LISTA DE CUADROS	
LISTA DE FIGURAS	
LISTA DE GRÁFICOS	
Capítulo 1: INTRODUCCIÓN	01
1.1. Situación problemática	01
1.2. Formulación del problema	02
1.3. Justificación teórica	02
1.4. Justificación practica	03
1.5. Objetivos:	03
1.5.1 Objetivo general	03
1.5.2 Objetivos específicos	03
CAPITULO 2: MARCO TEORICO	04
2.1. Antecedentes	04
2.2. Aspecto botánico	06
2.3. Bases teóricas	08
2.3.1. <i>Fisiopatología del hígado</i>	08
2.3.2 <i>Radicales libres y antioxidante</i>	09
2.3.3 <i>Toxicidad del Paracetamol</i>	10
2.4. <i>Marco Conceptual</i>	12
CAPITULO 3: METODOLOGÍA	13
3.1 Materiales	13
3.1.1 <i>Material biológico</i>	13
3.1.2 <i>Equipos e Instrumentos</i>	13
3.2. Tipo de investigación.	13

3.3. Tamaño de muestra y unidad de análisis	13
3.4. Recolección y clasificación de la muestra	13
3.4.1 <i>Recolección de la muestra</i>	13
3.4.2 <i>Clasificación de la muestra</i>	14
3.5 Método experimental	14
3.5.1 <i>Obtención del zumo fruta</i>	14
3.5.2 <i>Identificación de los metabolitos secundarios</i>	14
3.5.3 <i>Capacidad antioxidante in vitro</i>	16
3.5.3.a Capacidad de reducción del radical DPPH	17
3.5.3.b Capacidad de inhibir la lipoperoxidación	18
3.5.4. Evaluación de la capacidad hepatoprotectora	20
3.5.4.a Preparación de la muestra a ensayar	20
3.5.4.b Acondicionamiento de los animales de experimentación	20
3.5.4.c Evaluación de la hepatotoxicidad	20
3.5.4.d Preparación de los homogenizados	21
3.6 Determinación de aspectos morfológicos del tejido hepático	22
3.6.1. Índice hepático	22
3.6.2. Histológico	22
3.7. Marcadores Bioquímicos del daño hepático:	22
3.7.1. Determinación del nivel de glutatión (GSH)	22
3.7.2. Determinación de la lipoperoxidación	24
3.7.3. Determinación de la actividad de la Aspartato aminotransferasa	25
3.7.4. Determinación de la actividad de la Alanina aminotransferasa	26
3.7.5. Determinación de la actividad de la γ -glutamilttransferasa	27
3.7.6. Concentración de la Bilirrubina directa, indirecta y total	28
3.7.7. Determinación de la actividad de la Fosfatasa alcalina	29
3.7.8. Determinación de la concentración de Albúmina sérica	30
3.7.9. Determinación de la concentración de proteínas totales	31
3.8 Análisis e interpretación de la información	32
3.9 Consideraciones éticas	32
CAPITULO 4: RESULTADOS Y DISCUSIÓN	33
4.1 De la prueba de hipótesis	33

4.2	Presentación de resultados	33
4.2.1	<i>Aspecto físico del zumo</i>	33
4.2.2	<i>Presencia de metabolitos secundarios</i>	33
4.2.3	Capacidad antioxidante <i>in vitro</i>	34
4.2.3.1	Capacidad de reducir el radical DPPH	34
4.2.3.2	Capacidad de inhibir la lipoperoxidación	34
4.2.4	Evaluación de la Capacidad hepatoprotector	37
4.2.4.1	Niveles de los marcadores enzimáticos	37
4.2.4.2	Niveles de los marcadores no enzimáticos	39
4.2.4.3	Aspectos morfológicos	41
4.3.	Discusión de resultados	45
	CONCLUSIONES	54
	RECOMENDACIONES	55
	REFERENCIA BIBLIOGRAFICA	56

Dedicatoria

Dedico este trabajo a la memoria de mi madre la Dra. Benita Judith Gutiérrez Visa, que con sus palabras y cariño me supo guiar en esta vida.

Para ti muchas gracias.

A mi compañera y esposa Elena Silva, que con su amor y nuestros hijos hacen de la casa un hogar.

Agradecimiento:

Al Centro de Investigación de Bioquímica y Nutrición UNMSM por permitirme ejecutar la tesis en los laboratorios de Química y Bioorgánica.

A la Dra. Mercedes Soberón por aceptar guiarme en la presente investigación.

A las Dra. Inés Arnao, Dra. Doris Huerta, Dra. Silvia Suarez y Dra. Mercedes Soberón, ustedes no solo me enseñaron Bioquímica y sino también como ser docente.

Al profesor Miguel Hernán Sandoval Vegas, por ser un amigo, maestro y mentor. Gracias a usted me inicie en este mundo de la investigación.

A mis amigas Elsa y Dora, por su amistad y apoyo en todos estos años.

A mi padre Orlando Huamán y mis hermanos Juan, Zoraida, José y Cesar, por compartir bellos momentos en nuestras vidas.

A Lucila Vásquez que con su apoyo en casa permite que salgamos a trabajar tranquilo.

Al Vicerrectorado de Investigación y Posgrado por el financiamiento del presente trabajo.

LISTA DE CUADROS

Cuadro N° 1: Inducción de la lipoperoxidación en tejido hepático *in vitro* por el sistema $\text{Fe}^{+2}/\text{H}_2\text{O}_2$

Cuadro N° 2: Identificación de metabolitos secundarios presentes en el zumo y sobrenadante del zumo

Cuadro N° 3: Niveles de actividades de la Gamma glutamil transferasa y fosfatasa alcalina por grupo de tratamiento

Cuadro N° 4: Nivel de actividad de las aminotransferasas en suero por grupo de tratamiento

Cuadro N° 5: Niveles de Bilirrubina directa, indirecta y total sérica por grupo de tratamiento

Cuadro N° 6: Niveles de albumina y proteínas totales en suero por grupo de tratamiento

Cuadro N° 7: Niveles de glutatión y lipoperoxidación en tejido hepático y suero por grupo de tratamiento

Cuadro N° 8: Índice hepático por grupo de tratamiento

LISTA DE FIGURAS

Figura N° 1: Planta de *Corryocactus brevistylus* (sanky)

Figura N° 2: Reducción del radical DPPH frente a un antioxidante.

Figura N° 3: Reacción del malonaldialdehído y ácido 2-tiobarbiturico

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico N° 01: Curva de reducción del DPPH por el sobrenadante del zumo

Gráfico N° 02: Curva de reducción del DPPH por vitamina C

Gráfico N° 03: Curva de inhibición de la lipoperoxidación por el zumo y sobrenadante del zumo

Gráfico N° 04: Curva de inhibición de la lipoperoxidación por vitamina E

LISTA DE MICROFOTOGRAFÍAS

Microfotografía 1: grupo I

Microfotografía 2: grupo II

Microfotografía 3: grupo II

Microfotografía 4: grupo IV

Microfotografía 5: grupo V

Microfotografía 6: grupo VI

Resumen:

Introducción: El uso de productos vegetales con propiedades curativas es una práctica muy ancestral, diversas instituciones internacionales reportan su uso en diferentes enfermedades, y entre ellas encontramos a las enfermedades hepáticas, que es una de las causas de morbilidad a nivel mundial. **Objetivo:** Analizar la capacidad antioxidante y el efecto del zumo del fruto *Corryocactus brevistylus* (sanky) en el hígado frente a la toxicidad por paracetamol en ratas. **Materiales y método:** se empleó el zumo y el sobrenadante del zumo del fruto de sanky y 48 ratas machos. La actividad antioxidante del zumo y del sobrenadante del zumo fueron evaluados por la capacidad de reducir al radical DPPH e inhibir la lipoperoxidación en homogenizado de tejido hepático frente al sistema $H_2O_2/FeSO_4$. Para la evaluación de hepatoprotección los animales fueron distribuidas aleatoriamente en seis grupos (n=8), recibiendo los siguientes tratamientos por 10 días, vía peroral: grupos I y II NaCl 0,9%, grupo III silimarina 100 mg/kg, grupo IV zumo 1 mL/kg, grupo V zumo 5 mL/kg y grupo VI zumo 10 mL/kg. A partir del sexto hasta el décimo día se administró paracetamol a 400 mg/kg (grupos II-VI). Terminado el tratamiento las ratas fueron sacrificadas, previa anestesia con vapor de éter dietílico, luego se realizó la punción cardiaca para la extracción de sangre y se procedió a extraer el hígado por medio de laparotomía. Del lóbulo mayor se seccionó dos porciones, uno fue conservado en formol y otra porción fue conservada a 4°C para el análisis bioquímico. **Resultados:** el zumo y sobrenadante del zumo presentaron capacidad antioxidante. La administración del zumo a diferentes dosis expresó una menor actividad de la AST, ALT y GGT, también mostró una menor concentración de bilirrubina directa y total, una mayor concentración de proteínas total y albumina sérica, sin embargo, mostró un incremento de la actividad de la fosfatasa alcalina y de lipoperoxidación (hígado y suero). El índice hepático fue menor y a nivel histológico presentó mejor conservación de las estructuras. **Conclusión:** El zumo del fruto del sanky presenta actividad antioxidante *in vitro* y efecto hepatoprotector en ratas con intoxicación hepática por paracetamol.

Palabras claves: Sanky, hepatoprotector, paracetamol, *Corryocactus brevistylus*.

Summary:

Introduction: The use of plant products with healing properties is a very ancestral practice, several international institutions report their use in different diseases, and among them we find liver diseases, which is one of the causes of morbidity and mortality worldwide. **Objective:** To analyze the antioxidant capacity and the effect of the juice of the fruit *Corryocactus brevistylus* (sanky) in the liver against the toxicity of paracetamol in rats. **Materials and method:** the juice and the supernatant of the juice of the sanky fruit and 48 male rats were used. The antioxidant activity of juice and juice supernatant were evaluated by the ability to reduce the DPPH radical and inhibit lipoperoxidation in liver tissue homogenate against the H₂O₂ / FeSO₄ system. For the evaluation of hepatoprotection the animals were randomly distributed in six groups (n = 8), receiving the following treatments for 10 days, peroral route: groups I and II NaCl 0.9%, group III silymarin 100 mg / kg, group IV juice 1 mL / kg, group V juice 5 mL / kg and group VI juice 10 mL / kg. Paracetamol at 400 mg / kg (groups II-VI) was administered from the sixth to the tenth day. After the treatment, the rats were sacrificed, after anesthesia with diethyl ether vapor, then the cardiac puncture was performed for blood collection and the liver was removed by laparotomy. Two portions were sectioned from the major lobe, one was stored in formalin and another portion was stored at 4 ° C for biochemical analysis. **Results:** the juice and juice supernatant had antioxidant capacity. The administration of the juice at different doses expressed a lower activity of AST, ALT and GGT, also showed a lower concentration of direct and total bilirubin, a higher concentration of total protein and serum albumin, however, it showed an increase in the activity of alkaline and lipoperoxidation phosphatase (liver and serum). The liver index was lower and at the histological level it presented better conservation of the structures. **Conclusion:** Sanky fruit juice has antioxidant activity in vitro and hepatoprotective effect in rats with hepatic paracetamol poisoning.

Keywords: Sanky, hepatoprotective, paracetamol, *Corryocactus brevistylus*.

LISTA DE ABREVIATURAS

AST: Aspartato aminotransferasa.

ALT: Alanina aminotransferasa.

FA: fosfatasa alcalina.

GGT: γ -glutamil transferasa

DPPH: 1,1-difenil-2-picril-hidrazil

GSH: Glutation.

TBARS: especie reactiva al ácido 2-tiobarbitúrico.

NAPQI: N-acetil-p-benzoquinonaimine.

DTNB: 5,5'-dithio-bis(2-nitrobenzoico ácido)-3-carboxyl-4-nitrophenildisulfide.

TCA: ácido tricloroacético.

TBA: Ácido 2-tiobarbiturico.

CAPITULO 1: INTRODUCCION

El uso de plantas medicinales y/o alimentos con propiedades funcionales es una práctica tan antigua como la civilización, sin embargo, mucha de estas prácticas no tienen respaldo científico. En nuestra situación, la falta de escritura prehispánica ha permitido que la información sobre el uso de plantas medicinales no quede registrada, y ha originado que dicha información solo se trasmita de forma oral, de generación en generación, significando que se distorsione a medida que transcurren los tiempos.

1.1. Situación problemática

A nivel mundial una de las principales causas de morbilidad y mortalidad son las enfermedades crónicas degenerativas (ECD) relacionadas al hígado (Farfán y Cabezas, 2002; Bustios, Dávalos y Román, 2007).

En el Perú las enfermedades crónicas del hígado entre ellas la cirrosis hepática presentan una mortalidad de 21,3 por 100 000 habitantes, correspondiéndole el noveno lugar en los fallecimientos generales, y ocupa el segundo lugar en las causas de las defunciones registradas entre los 20 a 65 años (Ministerio de Salud Perú (MINSA), 2010). La prevalencia de las enfermedades hepáticas en nuestro medio ha permitido que la población busque alternativas para prevenir y/o tratarlas originándose creencias y mitos, como el uso de la medicina tradicional o la automedicación, siendo estas compartidas sin distinguir el nivel socioeconómico ni educativo, condicionando en nuestro medio un mayor riesgo de enfermedad (Osorio, Patiño, Tagle y Huayanay, 2010; Llanos et al., 2001; López, Dennis y Moscoso, 2009).

A pesar de los grandes avances realizados en los últimos 30 años sobre el conocimiento y manejo de estas enfermedades, en Europa, 170 000 muertes anuales es atribuida a la cirrosis hepática, existiendo grandes variaciones entre los países de la región, 47 000 de los decesos están relacionados con el cáncer hepático. El consumo de alcohol es una de las principales causas asociadas a enfermedades hepáticas alcanzando en algunos países una tasa tan alta como 47 por cada 100 000 habitantes.

La prevalencia de la enfermedad del hígado graso no alcohólico varía entre 2% a 44% en la población general europea (incluyendo niños obesos) y 42,6 a 69,5% en las personas con diabetes tipo 2. (Blachier, Leleu, Peck-Radosavljevic, Valla & Thoraval, 2013).

Diversos estudios epidemiológicos han mostrado que el estrés oxidativo, es un proceso de desequilibrio entre la generación en exceso, de radicales libres (prooxidantes) y los sistemas de defensa antioxidante celular, los cuales podrían relacionarse con el origen o desarrollo de algunas enfermedades multifactoriales de carácter crónico (Berliner & Heinecke, 1996; Dean, Fu, Stocker & Davies, 1997). Tolonen, citado por Boza, indica el estrés oxidativo celular está relacionada a las enfermedades hepáticas (Boza, 2003), esta relación también se evidencia en otros estudios realizados por Robertson (2004), Okuda et al., (2002) y Miñana et al., (2002), en donde nos indican que las sustancias que atenúan el efecto de los radicales libres son los antioxidantes (Valko et al., 2007; Brow & Hu, 2001).

En el Perú, existen pocos estudios sobre las propiedades funcionales del *Corryocactus brevistylus* (Sanqui); algunos de ellos han reportado presencia de compuestos fenólicos y su relación con la capacidad antioxidante *in vitro*, del extracto etanólico (Matos, Paredes y Gonzales, 2010) y otros han cuantificado su contenido de vitamina C (Palomino et al., 2011).

1.2. Formulación del problema

¿Cuál es la capacidad antioxidante y efecto del zumo del fruto *Corryocactus brevistylus* (sanky) en el hígado frente a la toxicidad por paracetamol en ratas?

1.3. Justificación teórica

Estudios epidemiológicos han demostrado que existe menor incidencia de ECD cuando hay un alto consumo de verduras y frutas (Organización Mundial de la Salud (OMS), 2003), y en forma experimental, la administración previa de hojas, frutos, corteza y/o raíces puede ser efectivo frente a sustancias tóxicas (Troncoso y Guija, 2007; Sandoval, Lazarte y Arnao, 2008; Huamán, Sandoval, Béjar, Huamán y Tarazona, 2013; Caballero, 2014); estos efectos protectores son atribuidos a los

nutrientes y fitoquímicos con actividad antioxidante (Palomino, Guija y Lozano 2009; Guo & Yang, 2001).

Son muy pocos los estudios publicados acerca del fruto del sanky, sin embargo, los pobladores de la localidad de donde fue extraída la muestra le atribuyen propiedades tales como antiulceroso y hepatoprotector, los cuales muy probablemente están asociados a los diferentes metabolitos presente en la parte comestible del fruto.

1.4. Justificación practica

Los resultados de esta investigación permitirán conocer y corroborar o comprobar las bondades atribuidas al fruto del *Corryocactus brevistylus*, sobre su efecto hepatoprotector y su capacidad antioxidante, de esta manera se estaría dando las bases de futuras investigaciones para esclarecer si dicho fruto presenta propiedad funcional, y de esta forma promocionar su consumo y explotación de manera racional.

1.5. Objetivos:

1.5.1. Objetivo general

Analizar la capacidad antioxidante y el efecto del zumo del fruto *Corryocactus brevistylus* (sanky) en el hígado frente a la toxicidad por paracetamol en ratas.

1.5.2. Objetivos específicos

- Identificar los metabolitos secundarios presente en el zumo del fruto *Corryocactus brevistylus* (sanky).
- Evaluar la capacidad antioxidante del zumo y sobrenadante del zumo del fruto sanky *in vitro*.
- Determinar el efecto del zumo del fruto del sanky sobre los indicadores bioquímico del daño hepático frente a la toxicidad por paracetamol en ratas.
- Determinar el efecto del zumo de fruto del sanky en la morfología hepática frente a la toxicidad por paracetamol en ratas.

CAPITULO 2: MARCO TEORICO

2.1. Antecedentes

“El hígado es un órgano susceptible a fenómenos de intoxicación química debido principalmente a su función.....” esto fue expresado por Murray, Bender, Botham, Kennelly y Rodwell (2010). Estas sustancias químicas pueden estar presentes en el agua, alimentos procesados o sustancias farmacológicas (antibióticos, antiinflamatorios, etc). La ingestión de estas sustancias a dosis frecuentes y altas implican un daño funcional y/o estructural del hígado (Ramírez, Pascuzzo y Bastidas, 2009).

Numerosos estudios en nutrición humana evidencian una estrecha correlación entre el consumo de frutas y verduras con una menor incidencia de enfermedades crónicas degenerativas (Giovannucci, 1999; Organización Mundial de la Salud (OMS), 2003), este efecto positivo es atribuido a su alto poder de acción contra los radicales libres (capacidad antioxidante), debido a la presencia de vitaminas C y E, fibra dietaria, antioxidantes naturales como los polifenoles (flavonoides y taninos), pigmentos (carotenoides, antocianinas, betalainas) y minerales (Palomino, Guija y Lozano, 2009; Zapata, Gerard, Davies y Schvab, 2007).

Los estudios realizados señalan que el consumo de alimentos fuente de antioxidantes como la vitamina E, C y otras sustancias fitoquímicas (polifenoles, carotenoides, etc.) puede disminuir o prevenir la evolución de algunas ECD, indicando que la alimentación, con un mayor de vegetales, incrementan las defensas antioxidantes, atenuando los efectos del estrés oxidativo (Diplock, 1991; Manach, Scalbert, Morand, Resmesy y Jiménez, 2004; Gema y Martínez 1999).

La relación entre las enfermedades crónicas degenerativas y el estrés oxidativo ha impulsado a realizar investigaciones sobre compuestos fitoquímicos, presente en los alimentos, con la finalidad de atenuar los efectos nocivos de ciertas toxinas. Al ingerir estos compuestos fitoquímicos en los alimentos, con probable potencial funcional, estaría contrarrestando las alteraciones de nuestro mecanismo de defensa

antioxidante, siendo estos agentes denominados hepatoprotectores (Hevia, Wilckens, Berti y Fischer, 2007).

La planta *Silybum marianum* L. Gaertn (cardo mariano) del cual presenta un principio activo, que es la silymarina, ha sido utilizado durante varios años para el tratamiento de problemas del hígado. Esta sustancia presenta propiedades antiinflamatoria, antitumoral, antioxidante y hepatoprotectora. La forma de actuar de este compuesto es induciendo el crecimiento de nuevas células hepáticas, por lo que es recomendado en el tratamiento de hepatitis, cirrosis o cuando se ingieren drogas que causan daño hepático, como efecto colateral (Hevia et al., 2007).

Los resultados de un estudio con cáscara y semilla de *Vitis vinífera* L., mezclada con el alimento, presentó efecto hepatoprotector frente a la ingesta de alcohol al 5% (Sandoval, Lazarte y Arnao, 2008). Otro estudio indica que el extracto de hojas de perejil presentó capacidad antioxidante y hepatoprotector frente a la administración de paracetamol (250 mg/kg) en ratas, expresado a través de alanina aminotransferasa (ALT), γ -glutamyltranspeptidasa (GGT), glucosa-6-fosfato deshidrogenasa, lipoperoxidación y en las observaciones histológicas (Troncoso y Guija, 2007). Otra investigación reportó que el extracto acuoso de hojas de *Prunus boldus* (boldo) presentó efecto hepatoprotector frente a la toxicidad de la rifampicina tanto en los indicadores bioquímicos como histológicos (Olivares, 2015). Todos estos estudios atribuyen el efecto hepatoprotector a la presencia de los metabolitos con capacidad antioxidante.

El *Corryocactus brevistylus* (sanky) tiene utilidad terapéutica tradicional muy variada; al jugo (zumo) del fruto, en altas concentraciones, se le atribuyen propiedades laxantes, tenso regulador, también se emplea en la prevención de la gastritis y enfermedades hepáticas. Los pobladores utilizan la cáscara de la fruta para el lavado del cuero cabelludo, promoviendo el fortalecimiento de las raíces del cabello y el crecimiento capilar (Pardo, 2002).

El estudio realizado por Matos, Paredes y Gonzales (2010) pudo determinar que los compuestos fenólicos del sanky, se extraían mejor a 70° C y a una concentración del etanol del 90%, y su capacidad antioxidante *in vitro* del extracto se evidencio hasta

una dilución del 1/10 (p/v) frente al radical 2,2-difenil-1-picrihidrazilo (DPPH), el cual es equivalente a 439,11 µg de Trolox/g muestra (Matos A et al., 2010).

Otro estudio realizado con dos ecotipos de sanky (pequeño y grande) reportó una concentración de vitamina C de 56 mg/100 y 48 mg/100 g de pulpa, respectivamente. También presentó una buena actividad antioxidante frente al sistema ascorbato/Cu⁺² (Palomino et al., 2011).

2.2 Aspecto botánico:

El termino *Corryocactus* tiene origen en honor al ingeniero jefe de los ferrocarriles de la Corporación del Sur del Perú Corry, y *Brevistylus* de la América “brevis”, corto, pequeño (<http://WWW.eriosyce.info/corryocactus/brevistylus/brevistylus,htm>).

El “sanky”, científicamente es denominado *Corryocactus brevistylus ssp. puquiensis* (Rauh Backeberg), perteneciente a la familia de la cactáceas. Son plantas perennes en forma de columna, oriundas de los andes del Perú. Su cultivo se da entre los 2 600 a 3 400 m de altura (Cáceres, García, Ponce y Andrade, 2000). (Figura 1)



Figura 1. Planta de *Corryocactus brevistylus* (sanky)

<http://cultivosantiguos.blogspot.pe/2011/03/sanky-fruta-medicinal-andina.html>

Según el grado de madurez el fruto es globular de color verde amarillo y de sabor ácido a ligeramente neutro, siendo consumido como fruta entera y es apreciado por la población, siendo empleado en la elaboración de mermeladas, jugos, etc. (Pardo, 2002).

El fruto comestible llamado también “sancayo” se comercializa en los mercados de Arequipa y Tacna, y es rico en ácido ascórbico. El Fruto es jugoso, comestible y espinoso los cuales lo pierde al madurar. Las semillas son ovales, con cubierta mucilaginosa (Ministerio del ambiente (MINAM), 2010).

La planta del sanky puede alcanzar una altura de 2 a 3 m, usualmente son muy ramificada de la base. El color del tallo es verde claro y presenta de 6 a 7 costillas, muy prominentes, areolas grandes, circulares y elevadas, las espinas son desiguales, de 3 a 24 cm de largo. Las flores tienen forma de embudo y anchas, con una constricción por encima del ovario, son 9 cm de largo y 10 cm de ancho, el segmento del perianto es amarillo brillante, con tubo floral corto. Exactamente, el nombre específico de la planta alude al corto estilo floral (MINAM, 2010).

En el Perú esta planta crece en la región de Arequipa, Ayacucho, Moquegua, Tacna, y en Chile (Tarapacá e Iquique), principalmente en las laderas de los cerros, lugares rocosos, pedregosos y arenosos, con poca agua o humedad. La altitud de mayor concentración se encuentra entre los 2 500 a 3 000 m de altura (MINAM, 2010).

La clasificación taxonómica del *Corryocactus brevistylus* (sanky):

Reino: Plantae
Subreino: Tracheobionta
División: Magnoliophyta
Clase: Magnoliopsida
Subclase: Caryophyllidae
Orden: Caryophyllales
Familia: Cactaceae
Subfamilia: Cactoideae
Tribu: Pachycereeae
Género: Corryocactus
Especie: C. brevistylus

Estudio realizado por Galán de Mera, Linares y Campos (2012), sobre la distribución de las cactáceas en el Perú, encontró, por medio del dendrograma de Sorensen, dos

grandes ramificaciones de las cactáceas: el tipo “A” en donde no se encontró muestras de *Corrycactus brevistylus* ni *Browningia britton* y tipo “B” en donde los muestreos sí encontraron estos elementos. Estos resultados nos indican que el *Corrycactus brevistylus* se localiza en una zona termotropical y mesotropical, condiciones climatológicas que se localizan en el sur de nuestro Perú el cual corresponde a condiciones más térmicas y de menor altitud, ligadas a los valles interandino-occidentales de origen volcánico, encontrándose hasta unos 3 500 m de altitud. (Galán de Mera, 2012).

Teniendo en consideración todo lo mencionado y dada la necesidad de comprobar su efecto hepatoprotector, es que nos planteamos el objetivo de verificar si el zumo de pulpa de *Corryocactus brevistylus* (sanky) presenta capacidad antioxidante *in vitro* y efecto hepatoprotector. De confirmar la hipótesis, se estaría dando las bases de futuras investigaciones para esclarecer si dicho fruto podría ser un alimento funcional.

2.3 Bases teóricas

2.3.1. Fisiopatología del hígado

El hígado es uno de los órganos más nobles de nuestro organismo, en él se puede identificar varios tipos de células, de los cuales 2/3 están conformados por hepatocitos, estos desempeñan numerosas funciones, las cuales son vitales para nuestro organismo. Dentro de las funciones tenemos la síntesis proteica de muchos componentes séricos (factores de coagulación, proteínas de transporte, albúmina, factores hormonales y de crecimiento), la síntesis de los componentes de la bilis (ácidos biliares, colesterol y lecitina), la regulación y metabolismo de los nutrientes (glucógeno, glucosa, aminoácidos y ácidos grasos) y conjugación de compuestos de naturaleza lipofílica (bilirrubina, cationes, fármacos) con la finalidad de excretarlos por la bilis o la orina, también almacena algunos nutrientes como vitaminas (A, D, cobalamina) y el hierro (Braunwld at al., 2002).

Este órgano tiene una elevada susceptibilidad a sufrir la acción nociva de diferentes tipos de noxas como por ejemplo metabólicas, tóxicas, microbianas, circulatorias y neoplásicas. Estas noxas son capaces de producir lesiones hepáticas provocando una alteración funcional, pudiendo hasta poner en peligro, la vida del paciente (Cotran,

Kamur, Collins y Robbins, 2000). La hepatitis viral, en el Perú, es de alta endemicidad en varias regiones, mientras que el cuadro de cirrosis hepática es el factor más frecuente asociada a la mortandad (Farfán y Cabezas, 2002; Bustios, Dávalos y Román, 2007; Malpica et al., 2013).

2.3.2 Radicales libres y antioxidante

Los radicales libres (RL), son átomos o moléculas que tiene un electrón desapareado por lo que presenta una alta reactividad sustrayendo un electrón de moléculas estables, alcanzando una estabilidad electroquímica (Rybczynska, 1994; Coronado, Vega y León, Gutiérrez, Vázquez y Radilla, 2015).

A nivel celular los radicales libres son producidos constantemente como producto del metabolismo celular. En ciertas situaciones extremas, nuestras defensas antioxidantes, no son lo suficiente para neutralizar a los radicales libres, produciéndose un daño oxidativo (estrés oxidativo) que van a acarrear importantes alteraciones. Esto se debe a que los radicales libres provocan una reducción de la fluidez de la membrana, la cual es esencial para preservar la función celular (traducción de señales, secreción y endocitosis) ocasionando alteraciones en biomoléculas de los componentes celulares: ADN, fosfolípidos y proteínas (Bagcchi et al., 2000; Coronado et al., 2015).

Las alteraciones de las funciones básicas celulares van a acarrear una serie de alteraciones en tejidos y órganos, es así que diversas evidencias muestran que el estrés oxidativo, desequilibrio entre la generación de radicales libres y los sistemas de defensa antioxidante celular, podría relacionarse con el origen o desarrollo de enfermedades crónicas multifactoriales como la aterosclerosis, ciertas enfermedades hepáticas, el envejecimiento, hasta el cáncer, siendo un tercio de la enorme lista de problemas fisiológicos, que de alguna manera está asociada a una elevación de radicales libres (Okuda et al., 2002; Miñana et al., 2002; Evans, Goldfine, Maddus & Grodsky, 2003; Guija y Troncoso, 2007; Maldonado, Jiménez, Guapillo, Ceballos y Méndez, 2010; Coronado et al., 2015).

Así mismo pruebas indirectas experimentales, sugieren que existe un papel central de los radicales libres en la patogénesis de ciertas enfermedades hepáticas relacionadas al estrés oxidativo (Okuda et al., 2002) (Miñana et al., 2002) (Evans et al., 2003), y

que los mecanismos que atenúan estos efectos son las sustancias antioxidantes (Boza, 2003; Valko et al., 2007).

La producción de radicales libres forma parte del metabolismo oxidativo celular, en el caso del tejido hepático la producción de radicales se incrementa con el consumo de alimentos, alcohol, fármacos u otra sustancia externa (xenobiótico) capaz de provocar estrés oxidativo (Guija et al., 2007).

El hígado contrarresta los efectos nocivos de diversas sustancias, hasta cierta medida, como el paracetamol, que es capaz de generar lesiones iniciales en el tejido hepático. No obstante, cuando la reserva de defensa hepática disminuye se origina un daño secundario asociado a enfermedades, exponiendo en peligro la vida (Cotran et al., 2000).

2.3.3 Toxicidad del Paracetamol

El paracetamol en condiciones normales es conjugado, en un 90%, con el glucoronato o sulfatado y finalmente excretado por vía urinaria. Este fármaco se utiliza como analgésico, antipirético y no produce efecto hepatotóxico a dosis normal, sin embargo, en situación de sobredosis puede producir daño hepático (William, 2003; Vargas, 2016).

El mecanismo de toxicidad del paracetamol se encuentra bien documentada. Tras la administración de alta dosis del fármaco el citocromo P450 (CYP1A2, CYP2E1 y CYP3A) produce cantidades elevadas de N-acetyl-p-benzoquinone imine (NAPQI), esta sustancia es rápidamente detoxificado por conjugación con el glutatión (GSH), por tanto, es capaz de agotar las reservas de glutatión (GSH) de las células hepáticas. La toxicidad del NAPQI se desarrolla al unirse a macromoléculas, de forma covalente, produciendo radicales libres, presentando a nivel hepático necrosis en sólo 12 horas (William, 2003; Servicio de farmacia Hospital General Universitario de Alicante (SFHGUA), 2009; Vargas, 2016).

Cuando los niveles de GSH están disminuidos a un 70% o más, el NAPQI procedente de la sobredosis del paracetamol no puede ser eliminado totalmente, originando uniones covalentes entre NAPQI y las proteínas o la bicapa lipídica del

hepatocito, aromatizando los elementos reductores y generando necrosis centrolobulillar (Roldan y López, 2012; Vargas, 2016).

La peroxidación del paracetamol es realizada por la ciclooxigenasa 1 (COX-1) y la mieloperoxidasa, generando metabolitos tóxicos que van a provocar daño al tejido hepático, en especial a las personas con enfermedad renal crónica (López, Akerreta, Avero y Calvo, 2007).

La intoxicación por paracetamol se caracteriza por la evolución de una insuficiencia hepática por necrosis. El proceso de intoxicación puede dividirse, desde el momento de la ingesta, en cuatro etapas según el intervalo de tiempo:

Estadio I (0-24 horas post-ingestión): La persona suele ser completamente asintomática. Es probable que presenten náuseas, vómitos y malestar general. También se puede sentir dolor en hipocondrio y epigastria, en esta etapa no necesariamente desarrolla hepatotoxicidad (Agencia de Valencia de Salud (AVS), 2009; Vargas, 2016).

Estadio II: se desarrolla por lo general a partir de las 24 a 48 horas post-ingestión. La persona puede ser asintomática o presentar los síntomas iniciales de toxicidad como subictericia muco-cutánea y la hepatomegalia dolorosa. El incremento del ALT y AST se inicia entre las 24 y 36 horas, en algunas situaciones ocurre a las 16 horas o antes. La bilirrubina y el tiempo de protrombina pueden ser normales o se encuentran ligeramente alterados, aumenta la bilirrubina total a expensas de la bilirrubina indirecta, un incremento marcado de las actividades de transaminasas, observándose en las primeras 24 horas valores superiores a 1000 UI/L. También puede presentar signos de disfunción renal que están relacionada a necrosis tubular. Debido al daño hepático la síntesis de urea disminuye, es por ello que la uremia muchas veces puede ser normal (AVS, 2009; Vargas, 2016).

Estadio III: por lo general se inicia desde las 72 a 96 horas post-ingestión. En este periodo se presenta la mayor lesión hepática. El paciente puede seguir siendo asintomático o presentar un fallo hepático fulminante con encefalopatía y coma. Las actividades de ALT y AST pueden ser superiores hasta 100 veces los valores normales. La elevación del tiempo de protrombina alcanza su pico a las 72-96 horas. La recuperación completa se puede alcanzar con un tratamiento adecuado. El

fallecimiento generalmente ocurre entre el tercer y séptimo día, el cual está asociado a la coagulopatía, encefalopatía hepática y fallo multiorgánico. A pesar que a nivel renal el fallo sea severo, por lo general es reversible. (AVS, 2009; Vargas, 2016).

Estadio IV: puede evolucionar desde el cuarto día hasta dos semanas post-ingestión. Cuando el daño desarrollado en el estadio anterior es reversible, pueden presentar regeneración de hepatocitos y el paciente puede sobrevivir. La convalecencia por lo general es total en cinco a seis días. Cuando la toxicidad ha sido profunda el período de convalecencia puede durar por encima de dos semanas. El paciente que supera el cuadro de intoxicación casi en su mayoría no presenta ninguna disfunción hepática crónica (AVS, 2009; Vargas, 2016).

2.3. Marco Conceptual

- 1) **Paracetamol:** Nombre genérico del acetoaminofen, es empleado como analgésico y antipirético. Inhibe la síntesis de prostaglandinas en el sistema nervioso central y bloquea la generación de impulso doloroso a nivel periférico.
- 2) **Radicales libres:** son átomos o moléculas que tiene un electrón desapareado por lo que son muy reactivos (Freeman y Crapo, 1982).
- 3) **Hepatoprotección:** “Es la protección del hígado frente a los efectos nocivos de hepatotoxinas que se puede ingerir, o contrarrestar las alteraciones en el organismo de defensa antirradicalarios” (Gema et al., 1999).
- 4) **Zumo de fruto:** “Se entiende al extracto sin fermentar, pulposo, turbio o clarificado, destinado a consumo directo, obtenido por procedimiento mecánico a partir de fruta madura y sana” (Norma General del CODEX (CODEX), 2005).

CAPITULO 3: METODOLOGÍA

3.1 Materiales

3.1.1 Material biológico

- *Rattus norvegicus*, ratas albinas variedad Holtzman.
- Fruto de *Corryocactus brevistylus* (sanky).

3.1.2 Equipos e Instrumentos

- Homogenizador Tissue Tearor model 985370, 5 000 – 32 000 RPM. 1,2 A. BIOSPEC PRODUCTS, INC.
- Micropipetas: Hirschmann Laborgerate, Accumex
- Estufa, marca Unic's®
- Extractor Oster 300 Watts
- Balanza analítica, modelo RADWC®WTB200

3.2. Tipo de investigación

Analítico, experimental, longitudinal, y prospectivo. (Argimon y Villa 2009)

3.3. Tamaño de muestra y unidad de análisis

Para el estudio se empleó 48 ratas albinas machos de 3 meses de edad cuyo peso promedio fue de $262,65 \pm 28,40$ g, los cuales fueron adquiridos del Centro de Producción de la Universidad Nacional Agraria La Molina.

3.4. Recolección y clasificación de la muestra.

3.4.1 Recolección de la muestra: El fruto del *Corryocactus brevistylus* (sanky) fue recolectado en la región de Ayacucho provincia de Huamanga en el mes de abril del 2014, teniendo en cuenta su estado de madurez biológica con la cáscara

íntegra, la cual fue identificada por su textura y color, luego fue almacenada en cajas de madera y envuelta en tela de yute, para su posterior envío a la ciudad de Lima.

3.4.2 Clasificación de la muestra: La clasificación taxonómica del fruto y del cladido (penca) fue realizado por el Museo de Historia Natural de la UNMSM, de acuerdo con el Sistema de Clasificación de Cronquist 1981.

3.5 Método experimental

3.5.1 Obtención del zumo de fruta: El zumo de la pulpa de fruta de *Corryocactus brevistylus* (sanky), se obtuvo mediante un extractor, a tempranas horas del día. Dicha muestra de zumo fue empleada para la identificación de metabolitos secundarios, determinación o medición de la capacidad antioxidante *in vitro* y la evaluación del efecto hepatoprotector.

El sobrenadante del zumo fue obtenido por centrifugación a 4 000 rpm por 5 minutos (2150 RCF).

3.5.2 Identificación de los metabolitos secundarios: para la identificación de metabolitos secundarios se empleó el zumo entero y el sobrenadante del zumo. Las muestras fueron conservadas en un frasco de color ámbar, hasta el momento de las pruebas químicas de Lock (1993).

La prueba cualitativa de metabolitos secundarios se realizó en el laboratorio de Farmacognosia de la Facultad de Farmacia y Bioquímica de la UNMSM, para ello se utilizaron las siguientes reacciones:

a. Reacción de Molisch: se tomó 1 mL de muestra problema (zumo entero y/o sobrenadante) más 3 gotas de solución del reactivo de Molisch “A” (alfa naftol 2% en alcohol), se homogenizó y luego se agregó H₂SO₄ concentrado. La reacción se consideró positiva para carbohidratos por la formación de un color violeta en la interfase.

b. Reacción de antrona: se tomó 1 mL de muestra problema (zumo entero y/o sobrenadante) y se añadió 1 mL de H₂SO₄ al 2%. La reacción se consideró positiva para carbohidratos si aparece el color verde.

c. Reacción de FeCl_3 : a 1 mL de muestra problema (zumo entero y/o sobrenadante) se añadió el reactivo de $\text{FeCl}_{3(\text{ac})}$. La reacción se consideró positiva para compuesto fenólicos, tipo taninos, cuando la reacción se torna verde-azulada.

d. Precipitación del colágeno: se tomó 1 mL del reactivo de colágeno (1 g% en 10% de NaCl) y luego se añadió gotas de la muestra problema (zumo entero y/o sobrenadante). La formación de un precipitado de color blanquecino indicó la existencia de taninos.

e. Reacción de Ninhidrina: se tomó 1 mL de muestra problema (zumo entero y/o sobrenadante) más el reactivo de Ninhidrina (solución etanólica de Ninhidrina al 1%), en algunos casos se calentó. La formación de un cromógeno violáceo determinó la presencia de grupos amino y aminoácidos libres.

f. Reacción de Shinoda: se tomó tres gotas de la muestra (zumo entero y/o sobrenadante), luego se agregó Magnesio y gotas de $\text{HCl}_{(\text{ac})}$ concentrado. La aparición del color rojo indicó la existencia de flavonoides, chalconas y auronas.

g. Reacción de Lieberman-Burchardat: se tomó tres gotas de muestra (zumo entero y/o sobrenadante) y se agregó el reactivo de Lieberman-Burchardat (gotas de cloroformo, anhídrido acético y de H_2SO_4 concentrado). La formación de los colores verde, azul, anaranjado o rojo, en zona, indicó existencia de triterpenoides o esteroides.

h. Reacción de Borntrager: se agregó 0,5 mL de muestra problema (zumo entero y/o sobrenadante), luego se añadió gotas del reactivo de Borntrager (NaOH 5%). La aparición del color rojo indicó la existencia de antranas, antronas y naftoquinonas.

i. Reacción de Dragendorff: se agregó 1 mL de la muestra problema (zumo entero y/o sobrenadante), luego se añadió gotas del reactivo Dragendorff (tetrayodobismutato potásico) en medio acidulado. La presencia de precipitado anaranjado o rojo-anaranjado indicó alcaloides.

j. Reacción de Mayer: se tomó 3 gotas de muestra problema (zumo entero y/o sobrenadante) más 4 gotas del reactivo de Mayer (tetrayodomercuriato potásico). La aparición de turbidez de color blanco indicó la presencia de alcaloides.

k. Reacción de Rosenheim: se tomó 4 gotas de la muestra problema (zumo entero y/o sobrenadante) más 4 gotas de reactivo de Rosenheim (solución de yodo yodurada). La formación de un color rojo oscuro indicó la existencia de antocianinas y flavonoides catéquicos.

l. Reacción de la espuma: se tomó 1 mL de muestra problema (zumo entero y/o sobrenadante) y se añadió 10 mL de agua, luego se agitó vigorosamente durante un minuto. La formación de espuma con una altura de 0,5 a 1 cm por 15 minutos indicó la presencia de saponina.

m. Reacción de Fehling: se tomó 1 mL de la muestra problema (zumo entero y/o sobrenadante), luego se añadió Fehling A y Fehling B, luego fue sometido a ebullición en baño María. La formación de precipitado de color rojo ladrillo indicó la presencia de azúcares reductores.

3.5.3 Capacidad antioxidante *in vitro*:

Para evaluar la capacidad antioxidante se empleó el zumo entero y el sobrenadante del zumo del fruto del *Corryocactus brevistylus* (sanky) por los siguientes métodos:

- a. Capacidad para reducir el radical DPPH, método propuesto por Brand-Williams et al 1995.
- b. Capacidad para inhibir la lipoperoxidación, generado por un sistema $\text{Fe}^{+2}/\text{H}_2\text{O}_2$, generador de radicales libres.

3.5.3.a Capacidad de reducción del radical DPPH. Según la técnica de Brand-Williams et al (1995).

Fundamento: El 1,1-difenil-2-picril-hidrazil (DPPH) es un radical libre, soluble en etanol y metanol, el cual presenta un electrón libre, que se

deslocaliza por toda la molécula. Esta sustancia para convertirse en una molécula estable capta un electrón o un radical hidrógeno.

Cuando se mezcla con una sustancia que pueda donar un átomo de hidrógeno, adquiere la forma reducida con la pérdida del color violeta a un amarillo pálido por la presencia del grupo picril.

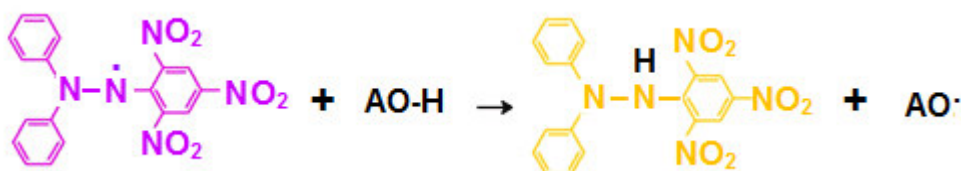


Figura N° 2: Reducción del radical DPPH frente a un antioxidante

Reactivo:

1,1-difenil-2-picril-hidrazil (DPPH) 2 mg% en metanol.

Etanol absoluto.

Sobrenadante del zumo.

Protocolo:

Para el ensayo se empleó el sobrenadante del zumo a las siguientes diluciones: 1/150; 1/100; 1/80; 1/60 y 1/50, estas diluciones son equivalentes a las siguientes concentraciones del sobrenadante del zumo: 0,278; 0,417; 0,522; 0,695 y 0,834 mg/mL respectivamente.

Se confeccionó una curva estándar de vitamina C a concentraciones de 1,80; 3,60; 5,40, 7,20; 9,00 y 18,00 µg/mL, a partir de un patrón de 3,60 mg/mL en agua bidestilada.

De las muestras diluidas y de los estándares se tomaron 0,4 mL de cada uno y se le agregó 0,8 mL de DPPH 2 mg%, dejándose reposar por 30 minutos protegido de la luz.

Para el control de DPPH se mezcló 0,4 mL de metanol + 0,8 mL de DPPH 2 mg%, se dejó reposar por 30 minutos protegido de la luz.

Las muestras se procesaron por duplicado. Concluido el tiempo fueron leídos a 517 nm.

Los resultados fueron expresados como IC50 del sobrenadante del zumo, el cual significa la concentración del sobrenadante del zumo necesario para reducir al 50% la absorbancia del control.

3.5.3.b Capacidad de inhibir la lipoperoxidación. Se empleó la técnica de inducción $\text{FeSO}_4/\text{H}_2\text{O}_2$, el cual permite generar radicales hidroxilos (OH^\cdot) y para cuantificar la lipoperoxidación se empleó la técnica de Buege y Aust (1978).

Para la evaluar la capacidad de inhibir la lipoperoxidación se utilizó el zumo y el sobrenadante del zumo.

Preparación del homogenizado de tejido hepático: se empleó 500 mg de tejido hepático de rata procedente del lóbulo mayor, el cual fue homogenizado en buffer fosfato pH 7,4 a 0,01 mol/L en un volumen final de 5 mL.

Fundamento: el radical hidroxilo (OH^\cdot), generado por el sistema $\text{Fe}^{+2}/\text{H}_2\text{O}_2$, ataca a los ácidos grasos poliinsaturados produciendo la peroxidación lipídica, formando dialdehídos, como el malonaldehído. Los dialdehídos formados reaccionan con el ácido 2-tiobarbitúrico (TBA) en la proporción 1:2, formando un compuesto de color rosado, el cual presenta una absorbancia máxima entre los 532 - 535 nm.

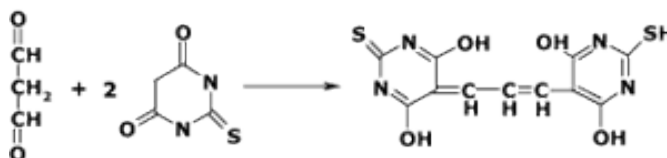


Figura N° 3. Reacción del malonaldehído y ácido 2-tiobarbiturico

Reactivos:

Ácido 2-tiobarbiturico 0,67% en $\text{HCl}_{(\text{ac})}$ 0,25 N (TBA/HCl).

Ácido tricloroacetico 20% (TCA).

Sulfato ferroso (FeSO_4) 3 mmol/L.

Peróxido de hidrógeno 30 mmol/L.

Zumo: expresado en dilución y concentración 1/4 (13,5 mg/mL); 1/2 (27,0 mg/mL) y 3/4 (40,5 mg/mL).

Sobrenadante del zumo: expresado en dilución y concentración 1/4 (10,43 mg/mL); 1/2 (20,86 mg/mL) y 3/4 (31,29 mg/mL).

Vitamina E: 0,5; 1,0; 1,5; 2,0; 2,5; 4,0 y 6,0 UI/mL.

Protocolo: se preparó la siguiente batería de tubos:

Cuadro N° 1: Inducción de la lipoperoxidación en tejido hepático *in vitro* por el sistema $\text{Fe}^{+2}/\text{H}_2\text{O}_2$

	Basal	Control	Zumo	sobrenadante	Vitamina E
μL Homogenizado	500	500	500	500	500
μL agua destilada	200	200	--	--	--
μL zumo	--	--	200	--	--
μL sobrenadante	--	--	--	200	--
μL vitamina E	--	--	--	--	200
Homogenizar y dejar incubar por 5 minutos a 37°C					
μL de agua destilada	100	--	--	--	--
μL FeSO_4 3 mmol/L	--	80	80	80	80
μL H_2O_2 30 mmol/L	--	20	20	20	20
Homogenizar y dejar incubar por 15 minutos a 37°C					

Concluida la incubación se tomó 500 μL de cada uno y se colocó en un tubo y se añadió 1 mL de TCA 20%, llevó a baño María hirviente por un tiempo 10 minutos. Terminado el tiempo, fue retirado y enfriado, luego se añadió 1,5 mL de ácido 2-tiobarbiturico y nuevamente se llevó, por 20 minutos, a baño María hirviente.

Al concluir el tiempo fue retirado, enfriado y centrifugado a 4 000 rpm por 15 minutos (2150 RCF) y posteriormente leído a una longitud de onda de 535 nm.

3.5.4 Evaluación de la capacidad hepatoprotectora:

3.5.4.a Preparación de la muestra a ensayar: El zumo del fruto se obtuvo mediante un extractor casero, el cual fue obtenido cada día del ensayo durante los diez días y conservado en frasco de color caramelo.

3.5.4.b Acondicionamiento de los animales de experimentación: Los animales fueron distribuidos aleatoriamente en seis grupos (n=8), colocadas en jaulas individuales, a temperatura de 20°C, con ciclos alternados de 12 horas de luz y de oscuridad, recibiendo alimentación balanceada obtenida de la Universidad Nacional Agraria La Molina y agua *ad libitum*, por un tiempo de siete días.

3.5.4.c Evaluación de la hepatotoxicidad: Se empleó la técnica propuesta por Gibson (Gibson, Pumford, Samokyszyn & Hinson, 1996) y por Troncoso et al., (2007), en donde se indujo a la toxicidad por paracetamol.

Terminado el tiempo de acondicionamiento se administró, vía peroral por diez días, los siguientes tratamientos:

Grupo I: Solución de NaCl 0,9% a 10 mL/kg.

Grupo II: Solución de NaCl 0,9% a 10 mL/kg.

Grupo III: Silimarina 100 mg/kg.

Grupo IV: Zumo 1 mL/kg.

Grupo V: Zumo 5 mL/kg.

Grupo VI: Zumo 10 mL/kg.

Al sexto día se les administró paracetamol (400 mg/kg) a los grupos II al VI hasta el décimo día, con una hora de diferencia.

Terminado el tratamiento los animales fueron sometidas a 12 horas de ayuno, luego fueron anestesiadas con vapores de éter dietílico, la sangre se extrajo por punción cardíaca, protegido de la luz, para luego obtener el suero por centrifugación a 4 000 rpm (2150 RCF).

Los indicadores analizados en suero fueron:

Nivel de lipoperoxidación, actividad del AST, actividad del ALT, actividad de la fosfatasa alcalina (FA), actividad de la γ -glutamyltransferasa (GGT), concentración bilirrubina (total, indirecta y directa), concentración albúmina y proteínas totales.

Luego los animales fueron sacrificados, en estado de anestesia, por dislocación cervical, inmediatamente se extrajo el hígado, el cual fue lavado con NaCl 0,9% y pesado en balanza analítica.

Del lóbulo mayor se seccionó tres porciones, uno de 2 g, aproximadamente, para el estudio histológico y dos de 0,2 g, cada uno, para la preparación de los homogenizados, en los cuales se determinó:

Glutación (GSH) y especie reactiva al ácido 2-tiobarbiturico (lipoperoxidación).

3.5.4.d Preparación de homogenizados:

- **Homogenizado de tejido hepático para glutación (HGSH):** del lóbulo mayor se pesó 0,2 g de tejido y se homogenizó con EDTA 0,4 mol/L a 4°C en una proporción de 1/10.
- **Homogenizado de tejido hepático para lipoperoxidación (HLPP):** del lóbulo mayor se pesó 0,2 g y se homogenizó con buffer fosfato pH 7,4 a 0,01 mol/L, en una proporción de 1/10.

3.6. Determinación de aspectos morfológicos del tejido hepático:

3.6.1. Índice hepático: una vez lavado el hígado con de NaCl 0,9%, se secó con papel absorbente, para eliminar el agua de la superficie, y luego fue pesado en balanza analítica. El índice hepático se determinó mediante la siguiente fórmula:

$$IH = \frac{WH}{WA} \times 100$$

IH: índice hepático

WH: peso del hígado en gramos

WA: peso del animal en gramos

3.6.2. Análisis histológico: Se seccionó tres g aproximadamente del lóbulo mayor, el cual fue conservado en solución de formol 10% en NaCl 0,9%, para el respectivo estudio histológico por tinción de hematoxilina-eosina en el Instituto de Patología de la UNMSM. Los aspectos histológicos que se tomaron en cuenta fueron: incremento de la matriz extracelular (colágeno), fibrosis, organización de las células del lobulillo hepático, proporción núcleo-citosol, infiltración de células sanguíneas, vasos sanguíneos y conductos biliares.

3.7. Marcadores Bioquímicos del daño hepático:

3.7.1. Determinación del nivel de glutatión (GSH): método de Sadlak y Lindsay (2001).

Reactivos:

- 5,5'-dithio-bis(2-nitrobenzoico ácido)-3-carboxyl-4-nitrophenildisulfide (DTNB) a 0,01 mol/L en metanol absoluto
- Buffer Tris 40 mmol/L pH 8,9
- Ácido tricloroacético 50%

Fundamento: Los grupos sulfhidrilos del glutatión reaccionan con el DTNB, formando un compuesto de color amarillo, presentando una absorbancia máxima a los 412 nm.

Para evitar la activación de proteasas dependientes de Ca^{+2} , que liberan compuestos con grupos $-\text{SH}$, se empleó EDTA gélido, el cual actúa como quelante de cationes divalente, el Ca^{+2} .

Protocolo: Se cogió del 1 mL del HGS y se añadió 800 µL agua destilada con 400 µL de TCA, se agitó por 10 minutos. posteriormente fue centrifugado a 4500 rpm (2722 RCF) por 15 minutos.

Se tomó 500 µL del sobrenadante y se añadió 2 mL de buffer tris y 25 µL de DTNB, se agitó para homogenizar.

Las lecturas fueron realizadas a la longitud de onda de 412 nm.

Se elaboró una curva estándar de GSH, a las siguientes concentraciones: 3,125; 6,25; 12,5, 25 y 50 µmol GSH/mL

La concentración de GSH en el tejido hepático fue calculada mediante la siguiente formula:

$$GS - NP(\mu mol/g) = \frac{ABS(MP - Bl) \times FC \times VH1 \times Vdesp \times VRx}{VH2 \times WH \times Vsn}$$

ABS(MP-BI): absorbancia de la reacción final - absorbancia del blanco.

FC: factor de calibración

VH1: volumen del homogenizado

VH2: volumen del homogenizado empleado para el desproteínizado.

Vdesp: volumen del desproteínizado.

VRx: volumen de la reacción.

WH: peso del hígado para desproteínizado

Vsn: volumen del sobrenadante empleado para la reacción.

3.7.2. Determinación de lipoperoxidación en tejido hepático y suero.

Método de Buege y Aust. (Buege J 1978),

Reactivos:

- Ácido tricloroacético 20% (TCA)
- Ácido 2-tiobarbitúrico 0,67% en HCl 0,25 N (TBA/HCl)

Fundamento: los radicales libres generados por el metabolismo de los xenobióticos (paracetamol) inducen un proceso de lipoperoxidación de los ácidos grasos poliinsaturados, generando dialdehídos de bajo peso molecular como el malonaldialdehído. Los dialdehídos reaccionan con el

TBA en la proporción de 1:2, formando un compuesto de color rosado, el cual expresa una absorbancia máxima a la longitud de onda de 535 nm.

Protocolo:

Lipoperoxidación en tejido hepático: Se colocó 300 µL del HLPP y 600 µL de TCA, en un tubo con tapa, luego fue llevado a temperatura hirviente en baño María por un tiempo de 10 minutos, luego se enfrió y se añadió 900 µL de TBA/HCl y se llevó nuevamente por 20 minutos a temperatura de 100°C en baño María. Terminado el tiempo fue centrifugado a 4000 rpm (2150 RCF) por 15 minutos. El sobrenadante obtenido fue leído a una longitud de onda de 535 nm.

El nivel de lipoperoxidación se determinó mediante la fórmula siguiente:

$$TBARS(nmol/g) = \frac{ABS(MP - Bl) \times VH \times 10 \times VRx}{\epsilon \times l \times V \times W}$$

ABS(MP – Bl): absorbancia de la reacción final - absorbancia del blanco.

VR_x: volumen final de la reacción.

ε: Coeficiente de extinción molar 1,56 x 10⁵ M⁻¹cm⁻¹

V: volumen del homogenizado para reacción.

l: longitud del ancho de la cubeta.

VH: volumen del homogenizado.

W: peso del tejido hepático.

Lipoperoxidación en suero: se tomó 300 µL de suero y se agregó 600 µL de TCA, y se llevó a temperatura hirviente en baño María por 10 minutos. Terminado el tiempo fue enfriado y añadió 900 µL de TBA/HCl y nuevamente se colocó, por 20 minutos, a temperatura de 100°C en baño María. Terminado el tiempo fue centrifugado a 4000 rpm (2150 RCF) por 15 minutos, el sobrenadante fue leído a una longitud de onda de 535 nm.

El nivel de lipoperoxidación se determinó por la fórmula siguiente:

$$TBARS(nmol/mL) = \frac{ABS(MP - Bl) \times VRx \times 10}{\epsilon \times l \times Vs}$$

ABS(MP-BI): absorbancia de la reacción final - absorbancia del blanco

V_{Rx}: volumen final de la reacción.

ε: Coeficiente de extinción molar 1,56 x 10⁵ M⁻¹cm⁻¹

Vs: volumen de suero.

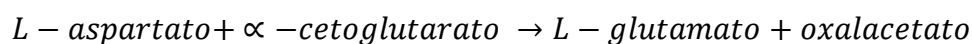
l: longitud del ancho de la cubeta.

3.7.3. Determinación de la actividad del Aspartato aminotransferasa (AST). Método de Raitman S y Frankel (Anderson y Cockayne, 1995).

Reactivos:

- Reactivo A: L-aspartato 100 mmol/L y α -cetoglutarato 2 mmol/L en buffer fosfatos 100 mmol/L, pH 7,4.
- Reactivo B: 2,4-dinitrofenilhidracina (2,4-DNFH) 1 mmol/HCl 1 mol/L.
- Reactivo C: NaOH 0,4 N.

Fundamento: El aspartato (sustrato) reacciona con el α -cetoglutarato, catalizado por la AST formado glutamato y oxalacetato, según la siguiente ecuación:



El oxalacetato reacciona con 2,4-dinitrofenilhidracina, en medio alcalino, formando oxal-dinitro-fenilhidrazona, el cromógeno formado fue leído en el espectrofotómetro 505 nm, la coloración es proporcional a la actividad del AST.

Protocolo: Se incubó 500 μ L de reactivo A por 5 minutos a 37°C en baño María, después se añadió 100 μ L de suero dejándose reposar exactamente por 30 minutos. Concluido el tiempo se añadió 500 μ L del reactivo B y se dejó en baño María por 10 minutos.

Terminado el tiempo fue retirado del baño María y se añadió 5 mL del reactivo C, se mezcló, luego de dos minutos fue leído en el espectrofotómetro a 505 nm.

Se elaboró una curva de actividad enzimática.

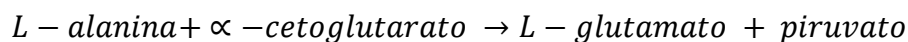
3.7.4. Determinación de la actividad del Alanina aminotransferasa (ALT).

Método Raitman S y Frankel (Anderson y Cockayne, 1995).

Reactivos:

- Reactivo A: L-alanina 200 mmol/L y α -cetoglutarato 2 mmol/L de en buffer fosfatos 100 mmol/L, pH 7,4.
- Reactivo B: 2,4-dinitrofenilhidracina (2,4-DNFH) 1 mmol/HCl 1 mol/L.
- Reactivo C: NaOH 0,4 N.

Fundamento: la alanina (sustrato) reacciona con el α -cetoglutarato catalizada por la ALT formando glutamato y piruvato, según la siguiente ecuación química:



El piruvato reacciona con 2,4-dinitrofenilhidracina, en medio alcalino, formando piruvato-dinitro-fenilhidrazona, el cual presenta a una longitud de onda máxima a 505 nm, la coloración es proporcional a la actividad del ALT.

Protocolo: se incubó 500 μ L del reactivo A a 37°C en baño María por 5 minutos, luego se añadió 100 μ L de suero y se homogenizó e incubó por 30 minutos exactamente a 37°C en baño María. Concluido el tiempo se añadió 500 μ L del reactivo B manteniéndolo en baño María por 10 minutos.

Terminado la incubación fue retirado del baño María y se añadió 5 mL del reactivo C, se mezcló, y luego de dos minutos fue leído en el espectrofotómetro a 505 nm.

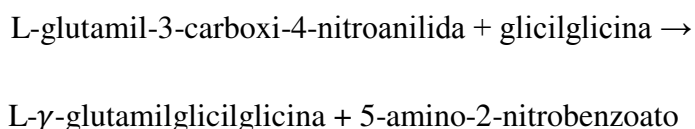
Se elaboró una curva de actividad enzimática.

3.7.5. Determinación de la actividad de la γ -glutamyltransferasa. Método S. Szasz G. (Anderson y Cockayne, 1995).

Reactivo: el reactivo único contiene:

Buffer Tris (100 mmol/L) pH 8,25; L- γ -glutamyl-3-carboxi-4-nitroanilida (2,9 mmol/L), glicilglicina (100 mmol/L).

Fundamento: La γ -glutamyltransferasa es una proteasa de tipo carboxipeptidasa que realiza siguiente reacción:



La 5-amino-2-nitrobenzoato formada, está en relación directa con la actividad de la enzima GGT, el cual presentó una mayor absorbancia a 405 nm.

Protocolo: En un tubo de ensayo se colocó 1 mL de reactivo de trabajo y se incubó a 37°C por 5 minutos, seguidamente se adicionó 100 μ L de suero y homogenizó. Las absorbancias fueron registradas a los tiempos de 1, 2 y 3 minutos exactamente, a la longitud de onda de 405 nm.

Se determinó el promedio de la diferencia de absorbancia por minuto ($\Delta A/\text{min}$).

La actividad de la enzima se determinó mediante la fórmula siguiente:

$$\gamma - \text{glutamyl transferasa } (U/L) = \Delta ABS /_{min} \times 158$$

3.7.6. Nivel de bilirrubina directa, indirecta y total. Método de Jendrassik-Grof (Anderson y Cockayne, 1995).

Reactivos:

- Reactivo A: benzoato de cafeína 130 mmol/L, tamponada y estabilizada.
- Reactivo B: ácido sulfanílico 29 mmol/L y HCl 170 mmol/L.

- Reactivo C: nitrito de sodio 70 mmol/L.
- Diazorreactivo: Reactivo C y reactivo B en la proporción de 1:21
- Bilirrubina: 100 mg/L

Fundamento: La bilirrubina, de forma específica, reacciona con el ácido sulfanílico diazotado formando la azobilirrubina que es un compuesto de color rojo-violáceo que presenta una absorbancia máxima a los 530 nm.

La bilirrubina directa (conjugada) reacciona con el diazorreactivo, sin embargo, la bilirrubina indirecta (no conjugada) necesita de un promovedor acuoso que es el benzoato de cafeína que va a favorecer la reacción.

La concentración de bilirrubina indirecta se determina por diferencia entre bilirrubina total y bilirrubina directa.

Protocolo:

Bilirrubina directa: en un tubo se colocó 200 µL de suero, 2,5 mL de agua destilada y 200 µL de diazorreactivo, se mezcló y se dejó en reposo exactamente por 5 minutos. Seguidamente fue leído en el espectrofotómetro a 530 nm.

Bilirrubina total: en un tubo se colocó 200 µL de suero, 2,5 mL de reactivo A y 200 µL de diazorreactivo, se mezcló, dejándolo en reposo por 5 minutos, posteriormente fue leído a 530 nm.

Estándar de bilirrubina: en un tubo de ensayo se añadió 200 µL del estándar de bilirrubina, se agregó 2,5 mL de reactivo A y 200 µL de agua, se homogenizó y se dejó reaccionar por 5 minutos exactamente e inmediatamente fue leído a una longitud de onda de 530 nm.

Blanco muestra: se tomó 200 µL de suero, se agregó 2,5 mL de agua destilada y 200 µL de reactivo B, se homogenizó y se dejó en reposo exactamente por 5 minutos, seguidamente fue leído a 530 nm.

El nivel de bilirrubina total y directa se determinó por la fórmula siguiente:

$$[\text{Bilirrubina total } mg/L] = \frac{[St]}{ABS_{(St-BI)}} \times ABD_{(T-BI)}$$

$$[\text{Bilirrubina directa } mg/L] = \frac{[St]}{ABS_{(St-BI)}} \times ABD_{(D-BI)}$$

$$[\text{Bilirrubina indirecta } mg/L] = BT - BD$$

3.7.7 Determinación de la actividad de la Fosfatasa alcalina. Según método de Tietz N.1983. (Anderson y Cockayne, 1995).

Reactivos:

- Buffer: 4-aminoantipirina 29 mmol/L en de aminometilpropanol 3 mol/L pH 10 (a 37°C).
- Fenilfosfato de sodio 1,4 mmoles.
- Ferricianuro de potasio 10 mmol/L
- Estándar: fenol 200 UI/L.
- Reactivo sustrato: se mezcló fenilfosfato de sodio con el buffer

Fundamento del método: la fosfatasa alcalina hidroliza al fenilfosfato de sodio en medio alcalino tamponado con amoniometil propanol. El fenol liberado reacciona con 4-amino-antipirina y ferricianuro. La intensidad del color es directamente proporcional a la actividad enzimática y se midió a la longitud de onda de 520 nm.

Protocolo: En un tubo se añadió 500 µL del reactivo sustrato y se incubó a 37°C por 5 minutos, inmediatamente se añadió 50 µL de suero e incubó a 37°C por 10 minutos, luego se adicionó 2,5 mL de ferricianuro de potasio, se homogenizó y se retiró del baño maría, para ser leído a 520 nm.

El estándar se preparó utilizando el protocolo anteriormente descrito, pero empleando 0,5 mL de la solución de fenol 200 UI/L.

Se preparó un blanco reactivo con agua destilada.

La actividad de la fosfatasa alcalina se determinó mediante la siguiente formula:

$$\text{Fosfatasa alcalina (UI/L)} = \frac{200 \text{ UI/L} \times \text{ABS}_{(\text{MP-BI})}}{\text{ABS}_{(\text{St-BI})}}$$

200 UI/L: concentración del estándar de fenol.

ABS(MP-BI): absorbancia de la muestra problema restando del blanco.

ABS(St-BI): absorbancia del estándar restando del blanco.

3.7.8. Determinación de la concentración de Albúmina sérica: según el método de Bromo Cresol.

Reactivo:

- Reactivo de verde de bromo cresol (BCG): BCG 300 μmol/L, buffer acetato 100 mmol/L y polioxietilén lauril éter 0,9 g/L.
- Estándar de albumina: albúmina 3 g/dL.

Fundamento: La albúmina reacciona de forma específica con el anión 3,3',5,5'-tetrabromo cresolsulfon ftaleína, formando un cromógeno de color verde cuya intensidad de color es directamente proporcional a la concentración de albumina. El cromógeno formado presenta una absorbancia máxima a la longitud de onda de 625 nm.

Protocolo: En un tubo se colocó 2,5 mL del BCG a temperatura ambiente, seguidamente se añadió 10 μL de suero y se mezcló.

Se empleó un estándar de albúmina de 3 g/dL el cual siguió el mismo protocolo descrito para la muestra de suero.

Luego las muestras fueron leídas a los 5 minutos, a la longitud de onda de 625 nm.

La concentración de albumina sérica se determinó mediante la siguiente formula:

$$\left[\text{Albumina } g/dL \right] = \frac{[St] \times ABS_{(MP-BI)}}{ABS_{(ST-BI)}}$$

[St]: concentración del estándar de albumina. 3 g/dL

ABS(MP-BI): absorbancia de la muestra problema restando del blanco.

ABS(St-BI): absorbancia del estándar restado del blanco.

3.7.9. Determinación de la concentración de proteínas totales: método de Biuret

Reactivo:

- Reactivo de Biuret: Complejo EDTA/Cu⁺² 13 mmol/L en NaOH 875 mmol/L y alquil aril poliéter (AAP).
- Estándar de proteínas: solución de proteína 8 g/dL.

Fundamento: el Cu⁺² en medio alcalino reacciona con los enlaces peptídicos de las proteínas dando un complejo color violeta el cual tiene una absorbancia máxima a una longitud de onda de 540 nm.

Protocolo: En un tubo se colocó 1 mL de reactivo Biuret y se incubó a 37°C en baño maría por 5 minutos, inmediatamente se añadió 10 µL de suero y se mantuvo en baño María por 15 minutos.

Se empleó un estándar de proteínas de 6,5 g/dL, el cual siguió el mismo protocolo descrito para la muestra de suero.

Las muestras fueron leídas a los 5 minutos, a una longitud de onda de 540 nm.

La concentración de proteínas totales sérica se determinó mediante la siguiente formula:

$$\left[\text{Proteinas totales } g/dL \right] = \frac{[St] \times ABS_{(MP-BI)}}{ABS_{(ST-BI)}}$$

[ST]: concentración de estándar de proteínas: 6,5 g/dL

ABS(MP-BI): absorbancia del suero restando del blanco.

ABS(St-BI): absorbancia del estándar restado del blanco.

3.8 Análisis estadísticos de los datos:

Se empleó el paquete estadístico SPSS 17 y se aplicó la prueba de Shapiro–Wilk para ver la normalidad de los datos. Los indicadores que presentaron distribución simétrica se le aplicó el estadístico de ANOVA y posteriormente Tukey y para los indicadores con distribución asimétrica se aplicó el estadístico de Kruskal-Wallis.

3.9 Consideraciones éticas:

El tratamiento que se les dio a los animales de experimentación estuvo conforme al artículo 19 del Capítulo V “Tenencia, protección y manejo de animales” de la ley N° 30407 Ley de protección y Bienestar Animal (Perú, Ley N° 30407). Las técnicas empleadas consideraron dar el menor dolor posible a los animales (ratas) tanto en la aplicación de los medicamentos como en el método utilizado para su sacrificio previo a la extracción de sangre para los análisis bioquímicos, y a la extracción del hígado para estudio posterior, para ellos se tomó en cuenta el principio de las tres R (reducir, reemplazar y refinar) descrito por Pardo 2005.

CAPITULO 4: RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 De la prueba de hipótesis

Los indicadores que presentaron distribución normal fueron: bilirrubina directa, % de bilirrubina directa, fosfatasa alcalina, relación albúmina/globulina y % de albúmina ($p>0,05$), estos indicadores se le aplicó ANOVA y posteriormente Tukey para ver si existe diferencia estadística entre los grupos. Los datos fueron expresados en media \pm DE.

Los indicadores que no mostraron distribución normal fueron: índice hepático, lipoperoxidación en tejido hepático y suero, bilirrubina indirecta, bilirrubina total, glutatión (GSH) en tejido hepático, γ -glutamyl transferasa, albúmina sérica, proteínas séricas, ALT, AST, relación AST/ALT. A estos datos se le aplicó la prueba de Kruskal Wallis, para ver diferencias significativas entre grupos. Los datos fueron expresados en mediana \pm DE.

4.2 Presentación de resultados

4.2.1 Aspecto físico del zumo: El zumo obtenido por medio del extractor casero presentó una densidad de $0,986 \pm 0,009$ g/mL y una concentración de la parte sólida de $54,00 \pm 1,52$ mg/mL.

El sobrenadante del zumo obtenido por centrifugación presentó una densidad de $1,02 \pm 0,01$ g/mL y una concentración de la parte sólida de $41,72 \pm 0,67$ mg/mL.

4.2.2 Presencia de metabolitos secundarios: Se identificó la presencia de carbohidratos (++) y azúcares reductores (+) tanto en el zumo como en el sobrenadante del zumo, también se identificó compuestos fenólicos de tipo taninos y flavonoides, sin embargo, no se evidenció presencia de naftoquinonas, antranas y antranonas. Para antocianinas y flavonoides catéquicos solo se identificó en el zumo.

También se identificó alcaloides (++) y aminoácidos libres, tanto en el zumo como en el sobrenadante del zumo.

Cuadro N° 2: Identificación de metabolitos secundarios presentes en el zumo y sobrenadante del zumo

Reacción	Metabolito	Zumo entero	Sobrenadante del zumo
Reacción de Molisch	Carbohidratos	++	++
Reacción de antrona	Carbohidratos	+	+
Reacción de Fehling	Azúcares reductores	++	++
Reacción de FeCl ₃	Compuestos fenólicos (taninos)	+	++
Precipitación del colágeno	Taninos	+	+
Reacción de Shinoda	Flavonoides (chalconas y auronas)	+	-
Reacción de Lieberman-Burchardat	Esteroides o triterpenoides	-	-
Reacción de Borntrager	Naftoquinonas, antronas, antranonas.	-	-
Reacción de Rosenheim	Antocininas y flavonoides catéquicos	+/-	-
Reacción de Dragendorff	Alcaloides	++	++
Reacción de Mayer	Alcaloides	+	+
Reacción de Bertrand	Alcaloide	++	++
Reacción de ninhidrina	Aminoácidos libres y grupos aminos	+	+
Reacción de la espuma	Saponinas	-	-

(++) Moderado, (+) leve, (-) ninguno

4.2.3 Capacidad antioxidante *in vitro*

4.2.3.1 Capacidad de reducir el radical DPPH: Los resultados observados indican que el sobrenadante del zumo de *Corryocactus brevistylus* reduce al radical libre DPPH, presentando un IC₅₀ de 0,47 mg/mL, mientras que la vitamina C presentó un IC₅₀ equivalente de 5,61 µg/mL.

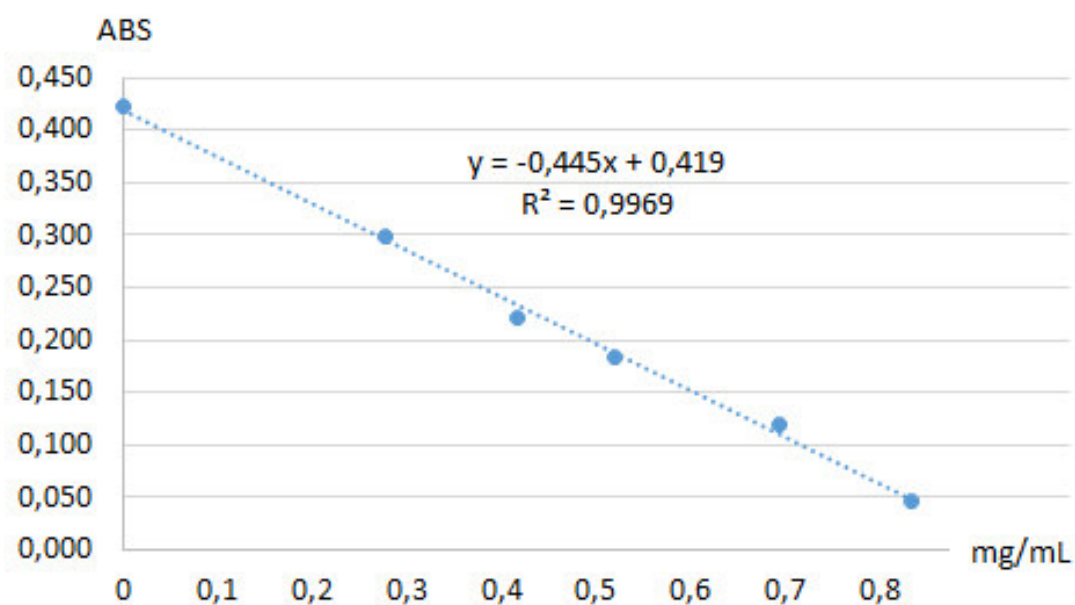


Gráfico N° 01: Curva de reducción del DPPH por el sobrenadante del zumo

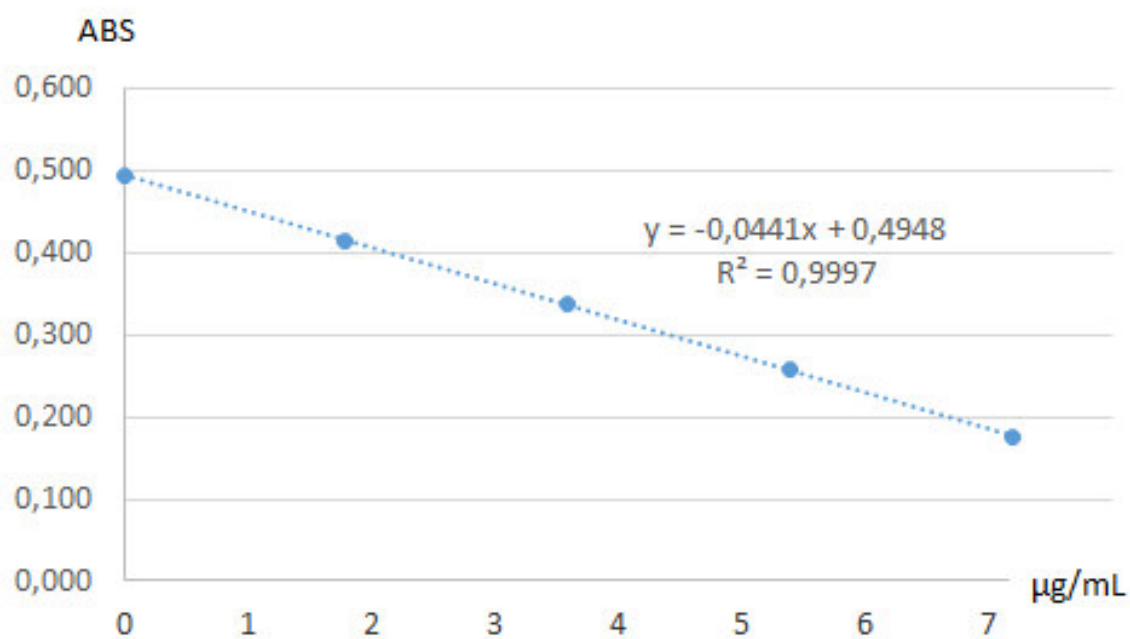


Gráfico N° 02: Curva de reducción del DPPH por vitamina C

4.2.3.2 Capacidad de inhibir la lipoperoxidación: Se observó que el zumo y sobrenadante del zumo presentaron capacidad de inhibir la lipoperoxidación en el homogenizado de tejido hepático frente al sistema $\text{FeSO}_4/\text{H}_2\text{O}_2$, presentando un IC_{50} para el zumo y sobrenadante del zumo 20 mg/mL y 15,73 mg/mL respectivamente.

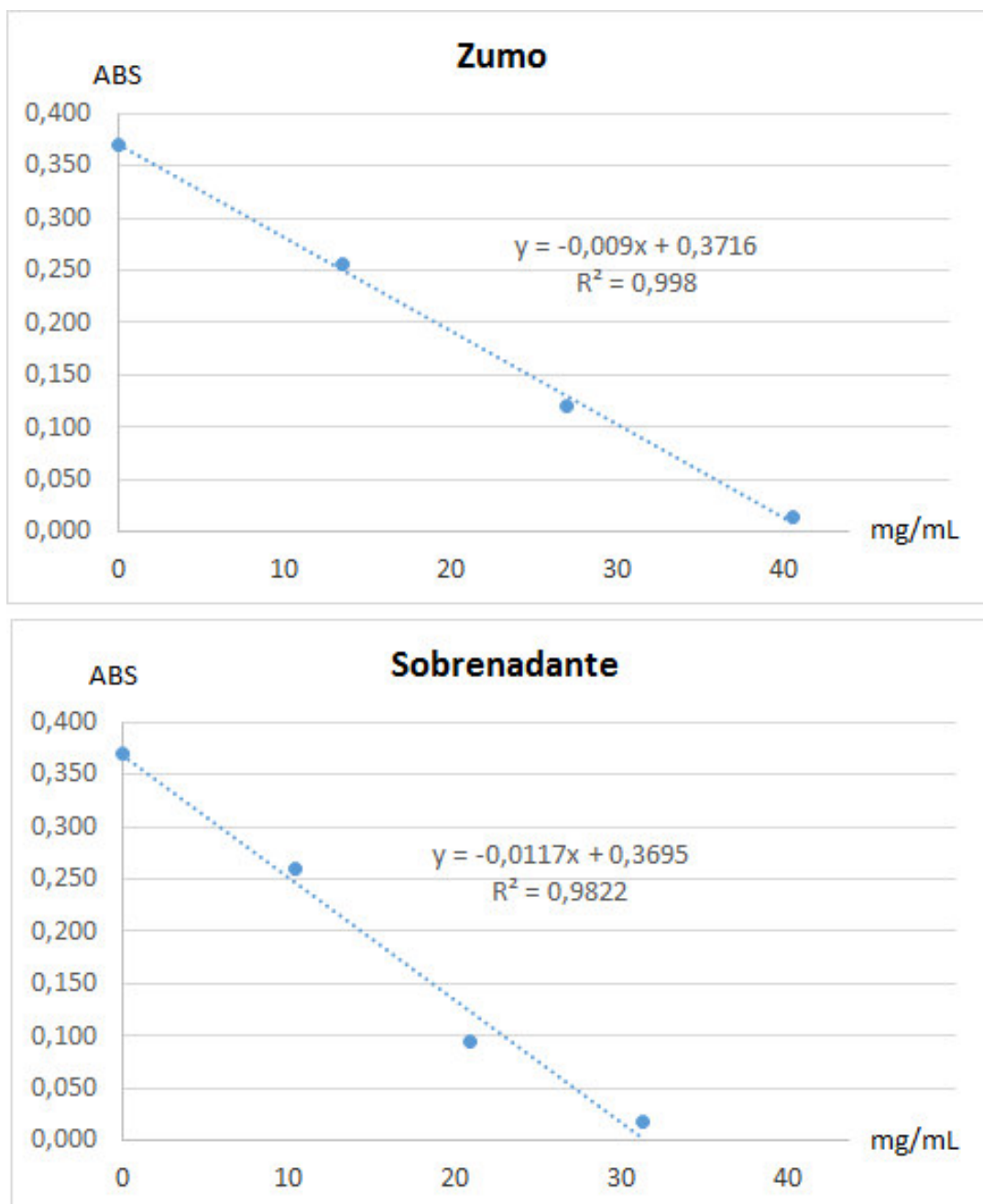


Gráfico N° 03: Curva de inhibición de la lipoperoxidación por el zumo y sobrenadante del zumo

Se preparó una curva de inhibición de vitamina E para este sistema y se observó que presentó 1,81 UI/mL (1,21 mg de equivalente de α -tocoferol/mL).

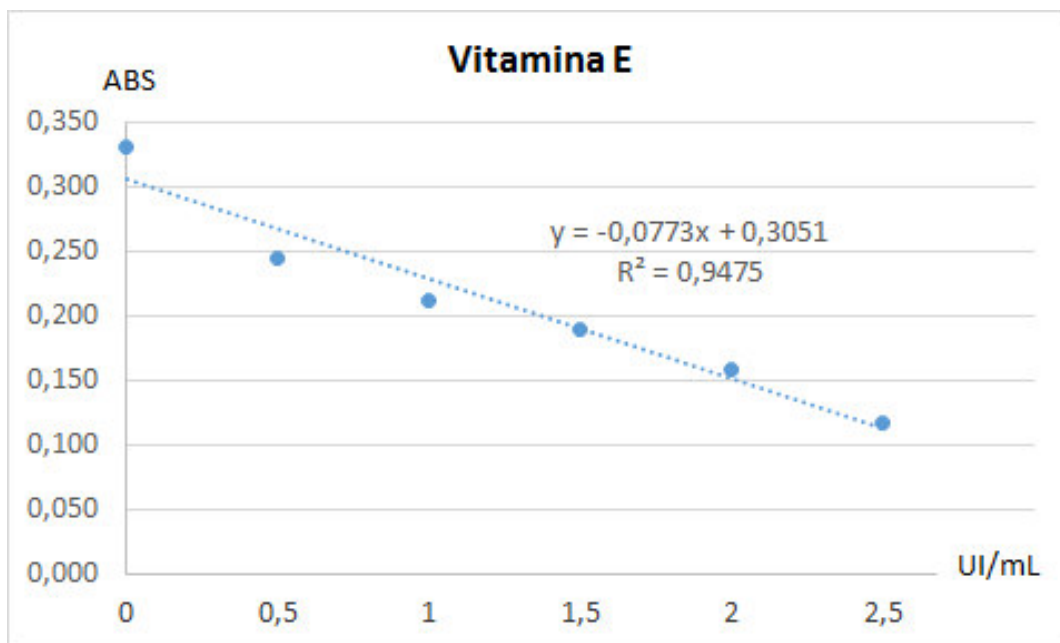


Gráfico N° 04: Curva de inhibición de la lipoperoxidación por vitamina E

4.2.4 Evaluación de la Capacidad hepatoprotectora:

4.2.4.1 Niveles de los marcadores enzimáticos: Se observa que tras el tratamiento con paracetamol 400 mg/kg el grupo II presentó niveles más altos para la γ -glutamyl transferasa (GGT), fosfatasa alcalina (FA), ALT y AST, con respecto al grupo I, siendo este de incremento significativo. También se observa una reducción en la relación de AST/ALT.

El tratamiento previo con silimarina 100 mg/kg (grupo III) presentó niveles menores de las actividades de estas enzimas, respecto al grupo II, también se observa un incremento en la relación AST/ALT.

Cuadro N° 3: Niveles de actividades de la Gamma glutamil transferasa y fosfatasa alcalina por grupo de tratamiento

Grupos	γ -glutamil transferasa*		Fosfatasa alcalina**	
	U/L	% inhibición	U/L	% inhibición
Grupo I	3,08 \pm 0,90 ^a	--	417,39 \pm 49,35 ^b	--
Grupo II	4,67 \pm 0,98	--	560,11 \pm 44,76	--
Grupo III	2,61 \pm 0,60 ^a	43,00	378,87 \pm 62,23 ^a	32,36
Grupo IV	2,90 \pm 1,25 ^{ac}	40,60	670,51 \pm 54,60 ^c	-19,71
Grupo V	3,18 \pm 0,57 ^{ac}	40,60	632,27 \pm 96,98 ^c	-12,88
Grupo VI	2,90 \pm 0,76 ^{ad}	42,00	665,33 \pm 110,89 ^c	-18,79

(a) p<0,01 respecto al grupo II.

(b) p<0,05 respecto al grupo II

(c) p<0,01 respecto al grupo III

(d) p<0,05 respecto al grupo III

* Kruskal Walli. MEDIANA \pm DE

** Análisis de varianza. MEDIA \pm DE

El tratamiento con zumo de sanky en las diferentes dosis presentó niveles más bajos de la actividad de AST, ALT y GGT, mientras que la actividad de la FA fue mayor, comparados con el grupo II. Se observó también que la relación AST/ALT fue mayor en el grupo V.

Cuadro N° 4: Nivel de actividad de las aminotransferasas en suero por grupo de tratamiento

Grupos	ALT*		AST*		AST/ALT*
	UI/L	% inhibición	UI/L	% inhibición	
Grupo I	10,70 \pm 0,77 ^{ad}	--	9,87 \pm 0,61 ^a	--	0,90 \pm 0,10 ^b
Grupo II	55,68 \pm 3,38	--	36,86 \pm 2,60	--	0,66 \pm 0,07
Grupo III	15,57 \pm 1,38 ^a	71,75	12,41 \pm 1,34 ^a	66,47	0,77 \pm 0,14
Grupo IV	22,15 \pm 1,95 ^{ac}	59,45	15,50 \pm 1,74 ^{ad}	56,80	0,70 \pm 0,06
Grupo V	19,04 \pm 4,18 ^a	64,16	18,35 \pm 2,24 ^{ac}	50,83	0,96 \pm 0,25 ^a
Grupo VI	25,65 \pm 4,34 ^{ac}	56,32	16,50 \pm 3,50 ^{ac}	54,56	0,65 \pm 0,14

(a) p<0,01 respecto al grupo II

(b) p<0,05 respecto al grupo II

(c) p<0,01 respecto al grupo III

(d) p<0,05 respecto al grupo III

* Kruskal Walli. MEDIANA \pm DE

4.2.4.2 Niveles de los marcadores no enzimáticos:

Bilirrubina sérica: directa, indirecta y total: El grupo II mostró mayor concentración de bilirrubina directa, representando el 45,24% de la bilirrubina total, respecto al grupo I (16,6%).

La administración con silimarina (grupo III) presentó concentraciones más bajas de bilirrubina directa representando el 26,77% de la bilirrubina total, comparado con el grupo II.

Cuadro N° 5: Niveles de Bilirrubina directa, indirecta y total sérica por grupo de tratamiento

Grupos	Bilirrubina directa**		Bilirrubina indirecta*		Bilirrubina total*		% de bilirrubina directa**
	mg/L	% inhibición	mg/L	% inhibición	mg/L	% inhibición	
Grupo I	0,68±0,21 ^{ab}	--	3,37 ±0,29	--	4,03 ±0,32	--	16,60 ±4,79 ^{ac}
Grupo II	2,20±0,20	--	2,72 ±0,28	--	4,82 ±0,36	--	45,24 ±3,40
Grupo III	1,25±0,20 ^a	43,18	3,39 ±0,25	-27,34	4,71 ±0,33	4,52	26,77 ±3,40 ^a
Grupo IV	1,42±0,33 ^a	35,45	2,88 ±0,47	-13,48	4,51 ±0,33	8,62	31,99 ±7,10 ^a
Grupo V	1,45±0,17 ^a	34,09	3,28 ±1,12	-29,59	4,66 ±1,18	-0,82	30,60 ±6,54 ^a
Grupo VI	1,30±0,18 ^a	40,91	3,67 ±1,63 ^a	-59,18	4,96 ±1,54	-14,17	25,66 ±8,14 ^a

(a) p<0,01 respecto al grupo II.

(b) p<0,01 respecto al grupo III

(c) p<0,05 respecto al grupo III

* Kruskal Walli. MEDIANA ± DE

** Análisis de varianza. MEDIA ± DE

En los grupos tratados con el zumo de sanky presentaron una menor concentración de bilirrubina directa (p<0,01), sin embargo, los niveles de bilirrubina total no mostraron diferencia significativa con el grupo II.

Albúmina y proteínas totales: Se observó un menor nivel de albúmina, proteínas totales, albúmina/globulina total y el % de albúmina tras el tratamiento de paracetamol (grupo II).

En el grupo III se observó una mayor concentración estos indicadores anteriormente mencionados, sin embargo, no llegaron a ser significativos al compararse al grupo II.

Cuadro N 6: Niveles de albumina y proteínas totales en suero por grupo de tratamiento

Grupos	Albúmina*		Proteínas totales*		Albúmina/globulina total**
	g/dL	% incremento	g/dL	% incremento	
Grupo I	3,39 ±0,09 ^{ac}	--	6,17 ±0,16 ^b	--	1,22 ±0,08 ^a
Grupo II	2,82 ±0,30	--	5,68 ±0,37	--	0,97 ±0,15
Grupo III	2,96 ±0,16	9,09	5,75 ±0,17	3,02	1,07 ±0,07
Grupo IV	3,50 ±0,17 ^{ac}	27,64	7,28 ±0,33 ^{ac}	28,60	0,95 ±0,10
Grupo V	3,53 ±0,11 ^{ac}	28,00	7,20 ±0,39 ^{ac}	25,40	1,01 ±0,13
Grupo VI	3,60 ±0,11 ^{ac}	30,91	7,46 ±0,49 ^{ac}	33,75	0,93 ±0,09

(a) p<0,01 respecto al grupo II.

(b) p<0,05 respecto al grupo II.

(c) p<0,01 respecto al grupo III.

(d) p<0,05 respecto al grupo III

* Kruskal Walli. MEDIANA ± DE

** Análisis de varianza. MEDIA ± DE

La administración del zumo a las diferentes dosis produjo mayor una concentración en los niveles de albúmina y proteínas totales, de forma significativa, sin embargo, la relación albúmina/globulina total mostró niveles similares al grupo II.

Glutación y Lipoperoxidación: En el grupo II se observó que la administración de paracetamol presentó concentraciones más bajas de GSH y que los niveles de lipoperoxidación (hígado y suero) fueron mayores (p<0,01), comparados con el grupo I.

La administración con silimarina + paracetamol (grupo III) produjo un mayor nivel de GSH (422%) y menor nivel de lipoperoxidación, tanto en tejido hepático (56,1%) y sérico (58,15%).

La administración del zumo a diferentes dosis causó un mayor nivel de GSH de forma significativa, comparado con el grupo II, sin llegar alcanzar el nivel observado en el grupo III. Los niveles de lipoperoxidación fueron mayores a lo encontrados en el grupo II, tanto en hígado como en suero. Solo el grupo VI mostró un nivel menor de lipoperoxidación sérico respecto al grupo II.

**Cuadro N° 7: Niveles de glutatión y lipoperoxidación en tejido hepático y suero
por grupo e tratamiento**

Grupos	Tejido hepático				Suero	
	GSH*		Lipoperoxidación*		Lipoperoxidación*	
	mg/g	% incremento	nmol/g	% inhibición	nmol/mL	% inhibición
Grupo I	4,97 ±0,76 ^a	--	15,13 ±1,24 ^a	--	3,12 ±0,49 ^a	--
Grupo II	1,66 ±0,27	--	32,73 ±2,55	--	6,23 ±1,06	--
Grupo III	8,90 ±1,04 ^a	422	15,21 ±1,77 ^a	56,10	2,58 ±0,28 ^a	58,15
Grupo IV	4,98 ±2,10 ^a	227	47,23 ±3,37 ^{ab}	-40,46	6,66 ±1,28 ^b	-12,85
Grupo V	5,87 ±0,89 ^a	258	43,71 ±3,67 ^{ab}	-71,57	6,96 ±1,28 ^b	-18,29
Grupo VI	6,79 ±1,11 ^a	306	48,74 ±3,92 ^{ab}	-44,11	5,52 ±1,23 ^b	8,24

* Kruskal Wallis. MEDIANA ±DE

(a) p<0,01 respecto al grupo II.

(b) p<0,01 respecto al grupo III

4.2.4.3 Aspectos morfológicos:

Índice hepático: Se observó que no presenta diferencia significativa entre los grupos I y II a pesar de que se observa un incremento de la masa hepática en el grupo II.

El tratamiento con silimarina + paracetamol (grupo III) redujo en un 10,57% la masa hepática respecto al grupo II.

Cuadro N 8: Índice hepático por grupo de tratamiento

Grupos	Índice hepático*	
	%	% inhibición
Grupo I	3,25 ±0,27	--
Grupo II	3,68 ±0,34	--
Grupo III	3,11 ±0,17 ^b	10,57
Grupo IV	3,15 ±0,12 ^b	9,43
Grupo V	3,30 ±0,26	8,29
Grupo VI	3,05 ±0,14 ^a	13,43

(a) p<0,01 respecto al grupo II.

(b) p<0,05 respecto al grupo II

* Kruskal Wallis. MEDIANA ±DE

El tratamiento con zumo en los grupos IV y VI presentaron capacidad de reducir la masa hepática en un 8,29% y 13,43% respectivamente.

Histológico:

Grupo I: presentó un aspecto normal, algunos núcleos picnóticos, con buena proporción entre núcleo y citosol. Las columnas de hepatocitos conservados y las vías biliares, vena y arteria con aspecto normal. Los hepatocitos se muestran bien delimitados.

Grupo II: Todas las muestras presentaron en promedio 20 células de Kupffer, el 20% de las células fueron picnóticas. También hubo un aumento de macrófagos de 50/campo, la tercera parte de la muestra presentó desorden periespacial, con fusión de las columnas de hepatocitos, presencia de edema, insipiente reacción fibrótica y algunos linfocitos. Congestión de los conductos biliares, mientras que las venas y arterias presentaron aspectos normales.

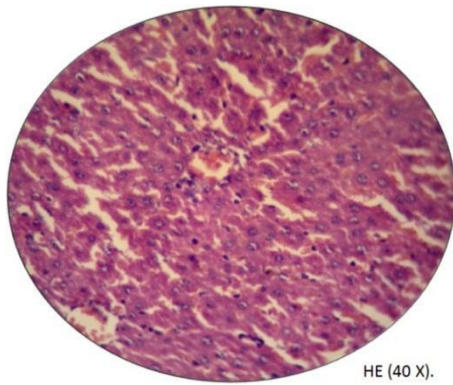
Grupo III: en este grupo se observó estructuras con orden en las columnas de hepatocitos. Presencia normal de espacio de Kiev. Las células de Kupffer fueron de 60 a 100/campo. Las apariencias de los hepatocitos fueron normales, la proporción de núcleo y citosol fueron normales. Algunas láminas presentaron un discreto desorden de células hepáticas e infiltración linfocitaria 10 por campo.

Grupo IV: Presentó alteración leve de la estructura de las columnas de hepatocitos. Las células de Kupffer fueron mayores de 50/campo, solo en una lámina fue de 20. Las venas presentaron vasocongestión y edema moderado en los conductos biliares. Los hepatocitos presentaron vacuolación y otros microvacuolación. También se presentaron hepatocitos fusionados y otros desligados. El 3% presentaron apoptosis. Los núcleos presentaron más del 20 al 30% de cariorrexis. La mitad de la muestra presentó discreta cantidad de macrófago (10 x campo).

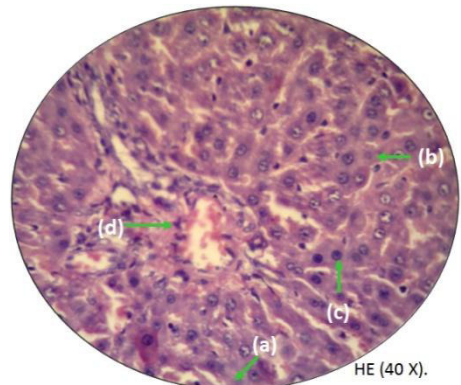
Grupo V: las muestras presentaron alteración leve en la estructura de las columnas de los hepatocitos. Las células de Kupffer fueron de 10 al 20, solo en una muestra fue de 150. Una muestra presentó vena con congestión, la mitad de las muestras presentaron edema de los conductos biliares. Desorganización de los hepatocitos con

células gigantes. En algunas muestras presentaron hipertrofia y apoptosis, edema. Escasas células con cariorrexis.

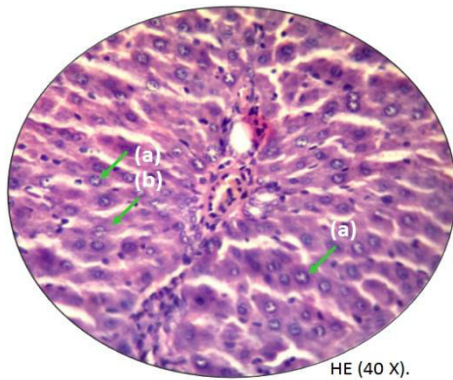
Grupo VI: la mitad de las muestras presentaron la leve alteración de las columnas de los hepatocitos. En el espacio de Kiev se observó más de 60 células de Kupffer, una muestra presentó solo 10 células de Kupffer. En una muestra hubo desaparición de canalículos por edema de hepatocitos, con infiltración de células de Kupffer. Se observa núcleos picnóticos en un 20%. En una muestra se observó un 40% de cariorrexis. También se observa un aumento de macrófago y cierta reacción granulomatosa.



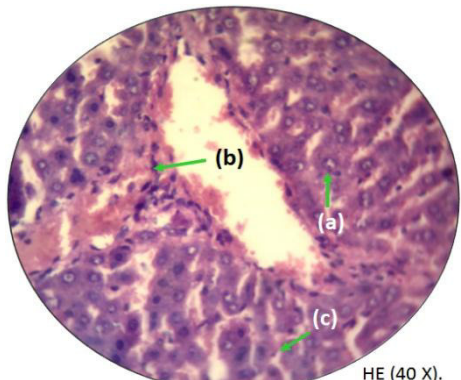
Microfotografía 1: Grupo I: Conservación de columna de hepatocito. Los conductos biliares, vena y arteria conservada. Algunos núcleos picnoticos. Buena proporción N/C.



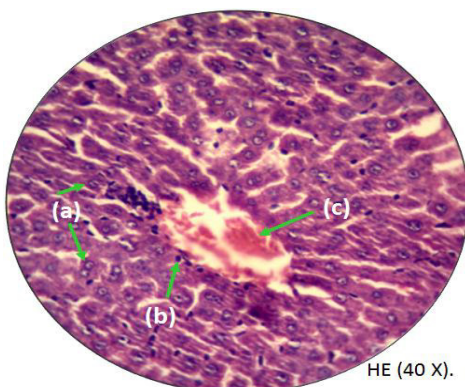
Microfotografía 2: Grupo II: (a) necrosis. (b) núcleo picnoticos. (c) homogenización de la cromatina. (d) células de Kupffer. Congestión de conductos biliares y edema.



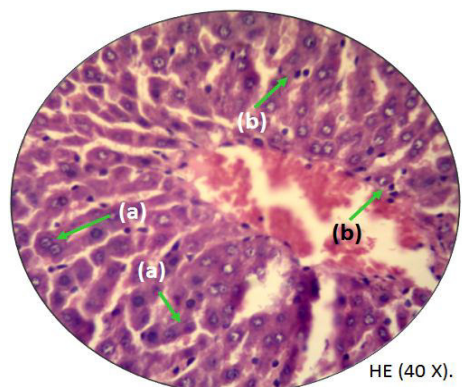
Microfotografía 3: Grupo III: (a) hepatocito binucleado. (b) hepatocito normal. Conservación de columna de hepatocito.



Microfotografía 4: Grupo IV: (a) hepatocito binucleado. (b) células Kupffer. (c) hepatocito buena proporción N/C. Leve alteración de la columnas de hepatocitos. Cariorrexis (30%).



Microfotografía 5: Grupo V: (a) hepatocito binucleado. (b) células de Kupffer 10 – 20. (c) vaso congestión. Leve alteración de columna de hepatocitos. Escasas células con cariorrexis.



Microfotografía 6: Grupo VI: (a) hepatocito binucleado. (b) células Kupffer. Leve alteración de las columnas de hepatocitos.

4.3 Discusión de resultados

El empleo de plantas medicinales es una práctica que el hombre ha utilizado desde tiempo ancestral, sin embargo, con el transcurrir de los años y en nuestra situación particular al no tener un apoyo en un lenguaje gráfico (escritura), este conocimiento ha ido perdiendo con el transcurrir de los tiempos. En los últimos años esta práctica ha cobrado interés en la comunidad científica, debido a que gran parte de las plantas medicinales y/o alimentos que se emplean no tienen estudios científicos que la respalden, sin embargo, las personas las consumen sin tener la certeza de su eficacia.

En el zumo y el sobrenadante del zumo se identificó taninos, flavonoides (chalconas y antocianinas) este último solo en el zumo. Los alcaloides se evidenciaron en ambas muestras.

En un estudio se cuantificó los compuestos fenólicos en varias muestras de *sanky* procedente de la Región de Ayacucho desde un rango de 0,405-1,012 mg/mL equivalente en ácido gálico (Matos et al., 2010). En otra investigación se reportó la presencia de vitamina C de dos ecotipos, uno procedente de la región de Moquegua (ecotipo pequeño) y otro procedente del Centro Comercial MINKA (Lima) (ecotipo grande), sin lugar fijo de procedencia, indicando que la concentración de vitamina C de los ecotipos fueron de 56 y 48 mg/100 g de pulpa respectivamente (Palomino et al., 2011). Nolasco & Guevara (2008) reporta una concentración de 57 mg/kg de vitamina C en la pulpa, en este mismo estudio indica también la presencia de azúcares reductores, antocianinas y mucilagos, sin embargo, reporta ausencia de alcaloides, taninos y flavonoides.

La capacidad antioxidante *in vitro*, encontrado en el sobrenadante del zumo por el método de DPPH presentó un IC₅₀ de 0,47 mg/mL, el cual es equivalente a 5,61 µg/mL de vitamina C. En el método Fe⁺²/H₂O₂, generador de radicales libres, el zumo y el sobrenadante del zumo mostraron capacidad de inhibir la lipoperoxidación con IC₅₀ de 20 y 15,73 mg/mL el cual es equivalente a 1,81 UI/mL de vitamina E.

Esta capacidad antioxidante *in vitro* puede estar relacionada a la presencia de metabolitos secundarios o fitonutrientes, identificado tanto en el zumo como en el sobrenadante del zumo en nuestro estudio. La presencia de taninos, flavonoides y

vitamina C pueden justificar dicha actividad antioxidante (Matos et al., 2010) (Palomino et al., 2011).

La capacidad antioxidante fue reportada por Nolasco (2008) quien indica una equivalencia en trolox de 474,8 $\mu\text{g/g}$, este estudio atribuye dicha capacidad a la presencia de vitamina C y compuestos antocianicos en la muestra. Matos (2010) también manifiesta la capacidad antioxidante del zumo de sanky el cual es dependiente de la concentración de los compuestos fenólicos en el extracto. Los compuestos fenólicos han sido estudiados por su capacidad de neutralizar los radicales libres, estos compuestos se encuentran distribuidos tanto en cáscara y en la parte de la pulpa.

El Fe^{+2} frente al H_2O_2 se oxida Fe^{+3} generando radical hidroxilo (OH^\bullet) el cual causaría el ataque de las biomoléculas como proteínas, DNA y los ácidos grasos polinsaturados de membrana, causando el proceso de lipoperoxidación y generando dialdehídos como el malondialdehidos. (Gutiérrez et al., 2014). Los compuestos fenólicos presentan capacidad antioxidante debido que son capaz de donar átomos de hidrogeno, principalmente aquellos que presentan anillo de catecol y la vitamina C también dona átomo de hidrogeno pasando de la forma de ácido ascórbico a ácido deshidroascórbico, (Arias y Rueda, 2016) los cuales serían los responsables de neutralizar al radical libre DPPH y de la inhibición de la lipoperoxidación generado por el sistema $\text{Fe}^{+2}/\text{H}_2\text{O}_2$, en el homogenizado de hígado.

La administración de paracetamol 400 mg/kg (grupo II) presentó mayor actividad de la GGT, FA, ALT, AST y una menor relación AST/ALT. También se observó mayor nivel de bilirrubina directa, indirecta, total y el % de bilirrubina directa. Igualmente se observó un menor nivel de albúmina, proteínas totales y la relación albúmina/globulina. Se encontró un mayor nivel de lipoperoxidación en suero y tejido hepático, en este último presentó un menor nivel de GSH. Respecto a lo morfológico el índice hepático fue mayor y se observó una mayor lesión a nivel histológico.

Lo descrito en el párrafo anterior guarda relación con los efectos de la biotransformación del paracetamol, el cual es metabolizado en un 90% mediante reacción de conjugación con el glucoronato o sulfato y luego eliminado por la orina.

Sin embargo, frente a la ingesta de altas dosis de paracetamol el citocromo P450 (CYP2E1, CYP1A2 y CYP3A) lo biotransforma en N-acetil-p-benzoquinonaimine (NAPQI), esta sustancia es capaz de disminuir los niveles de GSH mediante una reacción de conjugación, (Willian 2003), siendo el GSH el principal compuesto antioxidante intracelular, representando el 90-95% de los grupos sulfhídricos no proteicos (Denzoin, Soraci y Tapia, 2013) (Yoon, Babar, Choudhay, Kutner & Pyrsopoulos, 2016), esto podría explicar la depresión del GSH observado en el grupo II.

Cuando existe una sobredosis de paracetamol, el exceso de NAPQI no puede ser eliminado por conjugación, por lo tanto, reacciona con la bicapa lipídica del hepatocito y/o proteínas, aromatizándola e induciendo al cuadro de la lipoperoxidación, causando necrosis centrolobulillar (Mancipe, Fernández y Fernández, 2010) (Roldan y López, 2012) (Yoon et al., 2016), produciendo liberación del contenido a la circulación general, lo cual explicaría el incremento de lipoperoxidación (incremento de malonaldehído) tanto en tejido como en suero.

El cuadro de intoxicación hepática causa un incremento de la concentración de bilirrubina directa y total; también, se incrementa los niveles séricos de las transaminasas, en especial el ALT (AVS 2009) (Vargas 2016) (Yoon et al., 2016), los niveles séricos de ALT provienen principalmente de la región tres del acino hepático, el cual está relacionada a una necrosis, esto guarda relación con un menor nivel del GSH, que disminuye por el incremento de NAPQI. Estos eventos se relacionan con los niveles de lipoperoxidación, GSH y las actividades séricas de las transaminasas, en especial con el incremento de ALT y la relación AST/ALT, encontrada en el grupo II.

La elevación de los niveles de bilirrubina directa y total se presenta cuando hay necrosis y colestasis (Fernández E, Fernández J, Moreno I y Moreno M, 2008), guardando relación con la presencia de congestión de los conductos biliares, observado a nivel histológico. En este grupo también presentó una mayor actividad de la FA y GGT los cuales también están asociados específicamente a la obstrucción de los conductos biliares (Fernández et al., 2008) (Del Valle, Piñera, Medina y Sánchez, 2017), lo cual podría desarrollarse una enfermedad de tipo mixta (necrosis y colestasis) (González, Casado, García, y Gómez, 2018).

Uno de los efectos que presenta el paracetamol a nivel de las células hepáticas y de Kuffer es el incremento de los niveles de óxido nítrico (NO), el cual puede reaccionar con el anión superóxido y generar peroxinitrito oxidando los grupos sulfhidrilos generando radical oxidrilo ($\cdot\text{OH}$) (Hinson, Bucci, Irwin, Michael & Mayeux, 2002) (Tipoe et al., 2006). La administración del paracetamol (2 g/kg) induce a una mayor expresión del factor de crecimiento transformante beta ($\text{TGF-}\beta 1$) y el factor de necrosis tumoral alfa ($\text{TNF-}\alpha$) (Singh, Sidh, Chopra & Khan, 2016), el cual está relacionado a una reacción fibrótica e inflamatoria, observado histológicamente en el grupo II.

A nivel histológico el daño observado por la intoxicación por paracetamol guarda relación con el estrés oxidativo el cual es el resultado de un proceso combinado de la captación lisosómica de hierro y la disfunción de la membrana mitocondrial. Al disminuir el GSH por el NAPQI, el DNA mitocondrial sufre daño por los ROS y el peroxinitrito. El NAPQI se une también a una serie de proteínas mitocondriales, entre ellas la subunidad A de la ATP sintetasa, produciendo cese de la síntesis de ATP, este proceso desencadena la liberación del contenido mitocondrial, activación del factor inductor de apoptosis, edema celular, cariólisis, vacuolización, cariorexis, inflamación y por último liberación del contenido celular (Yoon et al., 2016).

La albumina es sintetizada por el tejido hepático y en situaciones de daño hepático por sustancias tóxicas, se ha observado que la síntesis de esta proteína disminuye, siendo utilizado tomado como un indicador de la función hepática en situaciones de fallo hepático agudo (Moreno, González, Mendoza, García y Moreno, 2007) (Reyes et al., 2017).

Los resultados observados en el grupo II también ha sido reportados por Troncoso (2007), quien empleó 200 mg/kg de paracetamol, encontrando un mayor nivel de ALT, AST y GGT, sin embargo, la albúmina y proteínas totales no mostraron diferencia significativa. A nivel del tejido hepático reportó un mayor nivel de lipoperoxidación, sin embargo, los niveles de GSH se incrementaron. En lo histológico se observó necrosis severa e hipertrofia de células de Kupffer.

Arnao, Suarez, Trabuco, Cisneros y Rodrigo (2012) empleando una dosis 250 mg/kg de paracetamol reportó que los niveles de AT, ALT y FA no presentaban diferencia

significativa con el grupo control, pero la GGT y la bilirrubina total mostraron un mayor nivel, acompañado de un menor nivel de lipoperoxidación en suero. Huamán, Sandoval, Béjar, Tarazona y Huamán (2013) empleando paracetamol a 400 mg/kg reportó un mayor nivel sérico de lipoperoxidación, bilirrubina directa y bilirrubina total. Respecto al tejido hepático se observó un mayor nivel de lipoperoxidación. Senthilkumar, Chandran & Parimelazhagan (2014), utilizando dosis única de paracetamol de 2 g/kg y luego de 14 días observó a nivel sérico un mayor nivel de la actividad del ALT, AST y FA, mientras que los niveles de bilirrubina no mostraron diferencia significativa y a nivel del tejido hepático presentó un menor nivel de GSH. Respecto a lo histológico se observó fibrosis en la región perivenular.

Abirami, Nagarami & Siddhuraju (2015), administró vía oral paracetamol 2 g/kg y se observó un mayor nivel de ALT, AST, FA y bilirrubina totales, y una disminución de proteínas totales, a nivel del tejido hepático se observó una mayor lipoperoxidación, observándose histológicamente inflamación leve del tracto portal, vacuolización de hepatocitos, cambios del contenido grasos y necrosis. Rehman et al. (2015), tras administrar una dosis de paracetamol de 2 g/kg de peso de conejo, a dosis fraccionada de 400 mg/kg, observó una mayor actividad de ALT, AST, FA y bilirrubina total. A nivel histológico reportó diversos grados de degeneración grasa, como hinchamiento de hepatocitos, infiltración de linfocitos y pérdida de los límites celulares.

En el grupo III (silimarina + paracetamol) a nivel sérico se reportó un menor nivel de GGT, FA, ALT, AST, bilirrubina directa, % de bilirrubina directa, y un mayor nivel de proteínas totales, un incremento de la relación albumina/globulina. La lipoperoxidación disminuyó a nivel del tejido hepático y en suero. A nivel histológico la estructura y apariencia de los hepatocitos fueron normales, con buena proporción de núcleo y citosol, en algunas láminas presentaron ligero desorden de células hepáticas.

La silimarina es un flavonoglicano extraído de las semillas y el fruto de *Silybum marianum* o “Cardo Mariano”, está conformado por una mezcla de tres compuestos diferentes: silibinina, silidianina y silicristina (Vásquez, Reyes, Fernández, Anaya y Rizzoli, 2013), son empleados en el tratamiento de enfermedades hepáticas por su efecto regenerador, inhibidor y antioxidante (Arroyo et al., 2012) (Saller, Brignoli,

Melzer & Meier, 2008), en otro estudio han reportado efecto inmunomodulador, antiproliferativo, antifibrótico y antiviral (Zhang, Hong & Tian, 2013), estos flavonoglicanos compiten a nivel de la membrana de los hepatocitos con las sustancias tóxicas por los receptores. Entre las sustancias tóxicas se cita al NAPQI (Vargas, 2016), y de esta forma se evita la inestabilidad de la membrana y se neutralizan a los radicales libres. También se estimula la reducción del GSSG a GSH y el metabolismo de los hepatocitos, induciendo la formación de ribosoma maduros y de esta forma se estimula la traducción de proteínas, incrementando la replicación de ADN y los procesos mitóticos (Pradhan & Girish, 2006), todo esto podría explicar lo encontrado a nivel histológico, GSH y lipoperoxidación.

En un proceso de reacción inflamatoria las citocinas involucradas inducen al factor de transcripción kappa β (NF κ B) los cuales induce a la promoción de genes específicos implicado en la respuesta inflamatoria e inmune. En estudio con línea celular HepG2 se observó que la silimarina anuló completamente la activación de NF κ B inducida por el ácido ocaico y lipopolisacárido (LPS) (Saliou, Rihn, Cillard, Okamoto & Packer, 1998).

La silimarina actúa también como un antioxidante, debido a su capacidad de donar hidrógenos y electrones, de esta forma previene la disminución de los niveles de GSH, frente a un cuadro de estrés oxidativo inducido por concentraciones altas de paracetamol (Saliou et al., 1998; Vázquez et al., 2013), esto podría guardar relación con un mayor nivel de GSH en el tejido hepático y un menor nivel de lipoperoxidación en el grupo III.

Arroyo et al., (2012), tras el tratamiento con silimarina a 25 mg/kg frente a Cl₄C, se observó un menor nivel sérico de la lipoperoxidación, disminución de la actividad del ALT, FA y un aumento sérico de proteínas totales y albumina, mientras que la bilirrubina directa y total no mostraron mayores diferencias, a nivel histológico la silimarina también mostró efecto protector con el grupo que recibió solo Cl₄C.

En un estudio en donde se empleó de silimarina a dosis de 70 mg/kg frente al paracetamol 300 mg/kg en ratones, se observó un menor nivel de lipoperoxidación en tejido hepático, un mayor nivel de GSH, sin embargo, la proporción de GSH/GSSG, se mantuvo prácticamente igual al grupo control y en lo histológico se encontró

alteraciones como citoplasma corpúsculo, células con núcleos pignóticos y zonas con edema, sin embargo, no se observó aumento de células Kupffer respecto al control (Hilario, Mejía, 2016).

Arnao et al., (2012), reporta el efecto protector que presenta la silimarina (50 mg/kg) en ratas frente a la toxicidad de paracetamol (250 mg/kg), dicho efecto se evidenció con la disminución, a nivel sérico, de la actividad del AST, ALT, bilirrubina total y un incremento de las proteínas totales, sin embargo, los niveles de FA, GGT y la lipoperoxidación aumentaron.

Estudio realizado por Huamán et al., (2013), reportó que la administración previa con silimarina (300 mg/kg) y frente al paracetamol (400 mg/kg) logró disminuir los niveles de lipoperoxidación (hígado y suero), sin embargo, el perfil de bilirrubina (directa y total) se mantuvieron elevados, mostrando niveles similares a los del grupo control.

Caballero (2014), observó que la administración de silimarina (100 mg/kg) y paracetamol (400 mg/kg) logró disminuir la actividad ALT y AST, al igual que el perfil de bilirrubina (directa y total), se incrementan los niveles de albumina y proteínas totales séricas, mientras que la lipoperoxidación en el tejido hepático y suero disminuyeron. En lo histológico se presentó una estructura conservada, con hepatocitos y núcleos normales.

En los grupos que recibieron el zumo de sanky, a diferentes dosis, se observó una menor actividad de la ALT, AST y GGT. Sin embargo, la FA presentó mayor actividad. La bilirrubina directa fue menor, mientras que la bilirrubina total mostró valores similares al grupo II. También se observó un menor índice hepático y en lo histológico presentó vasocongestión, vacuolación en hepatocitos, presencia de células de Kupffer y edema en los conductos biliares.

El sanky es un fruto de nuestro andes que según los resultados fitoquímico de nuestro estudio indica la presencia de taninos, flavonoides (anticininas, catéquicos, chalcona y auronas), también en otros estudios han sido reportados.

Las chalconas son compuestos que presentan propiedades antioxidantes, antitumorales, entre otras (Ramírez, Barajas, Pérez, Sáenz y Silva, 2012) (Insuasty,

2016), en un estudio se demostró que la administración de trans-chalcone redujo el efecto tóxico del paracetamol (dosis única de 2 g/kg), este efecto se expresó en una menor actividad del ALT, AST, FA y una menor concentración sérica de bilirrubina directa y total. También se reportó una menor lipoperoxidación y mayor nivel de GSH, en tejido hepático, a dosis de 20 mg/kg, siendo incluso más eficaz que la silimarina, en su capacidad antifibrótico e antiinflamatorio, reflejado por el factor de crecimiento transformante beta (TGF- β 1) y el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α), respectivamente. Esto podría explicar la ausencia de la reacción fibrótica en estos que recibieron el zumo de sanky en comparación al grupo II y otros aspectos bioquímicos también encontrados a nivel sérico y en tejido hepático (Singh et al., 2016). Otra familia de compuesto identificado en nuestro estudio son los flavonoides catequicos, estos presentan varias propiedades, entre ellos el antitrombótico, hipocolesterolémico, antiinflamatorio y antioxidante (Peñarrieta, Tejada, Mollinedo, Vila y Bravo, 2014).

Por el contenido de vitamina C el sanky puede ser considera fuente esta vitamina (Palomino et al., 2011) (Nolasco eta al., 2009), dicho metabolito ha sido evaluado como hepatoprotector frente a la etionina, sustancia que induce a un cuadro de hígado graso, demostrado disminuir los triglicéridos (grasa) y los niveles de lipoperoxidación en el tejido hepático. A nivel histológico la vitamina C también favoreció la conservación de los parámetros normales del tejido hepático (Mendoza et al., 2015). Siendo la vitamina un antioxidante hidrosoluble estaría neutralizando los radicales libres que se generarían durante el metabolismo del paracetamol, lo cual guarda relación con un menor nivel de lipoperoxidación encontrados con los grupos tratados con sanky.

En un estudio se evaluó el efecto protector de la vitamina C en ratas que presentaron deficiencia en la actividad del aldehído reductasa, enzima indispensable para la formación del ácido ascórbico, y se observó que causo la muerte prematura, tres días, frente a una dosis 300 mg/kg de paracetamol, mostrando niveles de ALT excesivamente alto, niveles de GSH muy bajos en tejido hepático y una gran área dañada a nivel histológico. Sin embargo, la suplementación con vitamina C en agua (1,5 mg/mL) mostraron valores normales en el ALT, el cual guardó relación con la conservación a nivel histológico. En este mismo estudio se evaluó el efecto protector

de la vitamina en una especie dependiente de este nutriente, cobayo, y se observó que la administración previa causó protección frente al paracetamol. En cultivos de hepatocitos deficiente de la aldehído reductasa con vitamina C (300 mmol/L) más N-acetil cisteína y frente al paracetamol (10-15 mmol/L) permitió la viabilidad del cultivo (Kurahashi *et al.* 2016).

CONCLUSIONES

- El zumo y el sobrenadante del zumo presenta metabolitos como flavonoides, taninos y alcaloides.
- El zumo y el sobrenadante del zumo presenta capacidad antioxidante frente al radical DPPH y la lipoperoxidación inducido *in vitro*.
- La administración del zumo de sanky favorece los indicadores del daño hepático en ratas, frente a la toxicidad por paracetamol.
- La administración del zumo de sanky reduce el daño hepático a nivel histológico en ratas, frente a la toxicidad por paracetamol.
- El zumo del fruto del sanky presenta actividad antioxidante *in vitro* y efecto hepatoprotector en ratas con intoxicación hepática por paracetamol.

RECOMENDACIONES

- Determinar las actividades de las enzimas superóxido dismutasa, catalasa, GSH reductasa y GSH peroxidasa.
- Identificar el tipo de metabolito presente en el zumo de sanky.
- Promover su consumo, como preventivo, de la forma tradicional.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- Abirami A, Nagarami G, Siddhuraju P. (2015). Hepatoprtective effect leaf extracts from *Citrus hystrix* and *C. máxima* against paracetamol induced liver injury in rats. *Food Science and Human Wellhness* 435-41
- Agencia Valenciana de Salud (Nov 2009). INTOXICACIÓN POR PARACETAMOL, Protocolo elaborado por Servicio de Farmacia, Servicio de Urgencias Generales y Servicio de Urgencias Pediátricas, Hospital General Universitario de Alicante.
- Anderson Sh y Cockayne. (1995). Química Clínica. Interamericana McGRAW-HILL. UTAH.
- Argimon J y Villa J. (2009) Metodología de Investigacion clínica y epidemiología. Tercera edición. Ed. ELSEVIER. Barcelona-España.
- Arias A, Rueda L, (8 de abril de 2016). “Cinética de la reacción de los radicales libres con antioxidantes naturales, fenoles”. Universidad Industrial de Santander Escuela de Ingeniería Química. Bucaramanga, Colômbia.
- Arnao A, Suárez S, Trabuco J, Cisneros R, Rodrigo ME. (2012). Efecto hepatoprotector del extracto acuoso de *Smallanthus sonchifolius* (yacón) en un modelo de intoxicación con acetaminofén. *An Fac med.*;73(3):239-44.
- Arroyo J, Almora Y, Quino M, Raez E, Martinez J, Buendia J, et al. (2012). Efecto protector en Cirrosis Hepatica inducida en ratas del extracto etanolico de las hojas de *Piper aduncum* comparado con Silimarina. *An. Fac. Med.*; 73(2): 85-91. 61.
- Bagchi D, Bagchi M, Stohs SJ, Das DK, Ray SD, Kuszynski CA, et al. (2000). Free radicals and grape seed proanthocyanidin extract: importance in human health and disease prevention. *Toxicology*; 148:187-97.
- Berliner J, Heinecke J. (1996). The role of oxidized lipoproteins in atherogenesis. *Free radic biol med.*;20:707-727.

- Blachier M, Leleu H, Peck-Radosavljevic M, Valla D-C, Roudot-Thoraval F, (2013). The burden of liver disease in Europe: A review of available epidemiological data. *Journal of Hepatology*.vol. 58 j 593–608
- Boza J. (2003). Alimentación y enfermedad. *Anales de la real academia de ciencias veterinarias de Andalucía Oriental*. 16(1): 163-197.
- Brand-Williams et al 1995
- Braunwld E, Ghany M, Hoofnagle J, Berk P, Wolkoff A, Dienstag J et all. (2002). Harrison. Principios de Medicina Interna. Editorial Mc Graw-Hill Interamericana de España, S.A.U. 15ª Ed. Madrid.
- Brow A, Hu F, (2001). Dietary modulation on endotelial function: inplications for cardiovascular diasease. *Am J Clin Nutr*;71:673-86.
- Buege J, Aust S. (1978). Microsomal lipid peroxidation. *Methods Enzymology*;52;302-6.
- Bustios C, Dávalos M, Román R. (2007). Características epidemiológicas y clínicas de la cirrosis hepática en la unidad de hígado del HNERM Es-Salud. *Rev.-Gastroenterol*; 27(3); 238-245.
- Caballero J. (2014). “Efecto hepatoprotector de la almendra de semillas de *Cucurbita maxima* (zapallo macre) en ratas”. (Tesis de pregrado). Universidad Nacional Mayor de San Marcos.
- Cáceres F, García A, Ponce E, Andrade R. (2000). “El sancayo” *Corryocactus brevistylus*. *Revista Quepo*; (14): 24-27.
- Coronado M., Vega y León S., Gutiérrez R., Vázquez M. y Radilla C. (2015). Antioxidantes: perspectiva actual para la salud humana. *Rev Chil Nutr Vol*. 42(2).
- Cotran R., Kamur V.,Collins T. ROBBINS. (2000). Patología estructural y funcional. España Editorial.Mc Graw-hill interamericana.S.A.U.6ª Ed. Madrid.
- Dean R, Fu S, stocker R, Davies M. (1997). Biochemistry and pathology of radical-mediated protein oxidation. *Biochem J*;324:1-18.
- Del Valle S., Piñera M., Medina N., Sánchez J. (2017). Colestasis: un enfoque actualizado. *MEDISAN*; 21(7):876.

- Denzoin L. Soraci A. Tapia M. (2013). Homeostasis del glutatión. *Acta Bioquím Clín Latinoam*; 47 (3): 529-39
- Diplock A. (1991). Antioxidant nutrients and disease prevention: an overview. *Am J Clin Nutr*;53:189-193.
- Evans J, Goldfine I, Maddus B, Grodsky G. (2003). Are oxidative stress-activated signalling pathways mediators of insulin resistance and beta-cell dysfunction? *Diabetes*; 52: 1-8.
- Farfán G, Cabezas C. (2002). Mortalidad por enfermedades digestivas y hepatobiliares en el Perú, 1995-2000. *Rev. Gastroenterol*; 22(4):310-323.
- Fernández Daza E., Fernández Juan E., Moreno Mejía I., Moreno Mejía M. (2008). Aproximación al diagnóstico de enfermedades hepáticas por el laboratorio clínico. *Medicina & laboratorio volumen 14, número 11-12.*
- Freeman B.A., Crapo J.D., (1982). Free radical and tissue injury. *Lab invest*;47:412-5.
- Galán de Mera A, Linares Perea E, Campos de la Cruz J. (2012). Patrones de distribución de las comunidades de cactáceas en las vertientes occidentales de los andes peruanos”. *Caldasia*, 34(2);257-275.
- Gema S, Martínez J. (1999). Efecto hepatoprotector inducido por el flavonoide astilvina frente a un modelo animal tratado con tetracloruro de carbono. *Rev Cubana Plant Med*; 1(4):36-9
- Gibson J, Pumford N, Samokyszyn V & Hinson J. (1966). Mechanism of Acetaminophen-Induced Hepatotoxicity: Covalent Binding versus Oxidative Stress. *Chem. Res. Toxicol.*, 9 (3), pp 580–585
- Giovannuci E. (1999). Tomatoes, tomato-based products, Lycopene, and cancer. Review of the epidemiologic literature. *J Natl Canc Inst*; 91:317-331.
- Gonzales-Amores Y., Casado-Bernabeu A., Garcia-Cortes M., Gomez-Navarro E. (2018) Afectación hepática en las enfermedades sistémicas. *RAPD ONLINE VOL.41.(4).*
- Guija E, Troncoso L. (2007). Radicales libres y envejecimiento. *Bol. Soc. Quím. Perú*; 66:33-50

- Guo C, Yang J. (2001). Progress in the study of antioxidant capacity of fruit and vegetables. *China public health*;17:87-88
- Gutiérrez J, Mondragón P, García L, Hernández S, Ramírez S, Núñez N. (2014). Breve descripción de los mecanismos moleculares de daño celular provocado por los radicales libres derivados de oxígeno y nitrógeno. *Rev Esp Méd Quir*;19:446-454
- Hevia F, Wilckens, Berti M, Fischer S. (2007) Calidad de Cardo Mariano (*Silybum marianum* (L.) Gaertn.) Cosechado en Diferentes Estados Fenológicos. *Inf. tecnol*;18(5):69-74.
- Hilario G, Mejía P. (2016). “Efecto hepatoprotector del zumo de cogollo de *Cynara scolymus* (corazón de alcachofa) en ratones sometidos a intoxicación por paracetamol”, (tesis de pregrado) Universidad Católica Sedes Sapientiae.
- Hinson, J.A., Bucci, T.J., Irwin, L.K., Michael, S.L., and Mayeux, P.R. (2002). Effect of inhibitors of nitric oxide synthase on acetaminophen-induced hepatotoxicity in mice. *Nitric Oxide*, 6(2):160-167. PMID: 11890740.
- <http://WWW.eriosyce.info/corryocactus/brevistylus/brevistylus.htm>.
- Huamán O, Sandoval M, Béjar E, Huamán Z, Tarazona V. (2013). Efecto de los extractos acuoso e hidroetanólico de hojas de *Bixa orellana* (achiote) sobre los indicadores no enzimáticos de la hepatotoxicidad por paracetamol, en ratas. *An Fac med*;74(4):279-83
- Insuasty-Obando B. (2016). Las chalconas y su uso como precursores en la síntesis de compuestos heterocíclicos nitrogenados. *Rev. Acad. Colomb. Cienc. Ex. Fis. Nat.* 40(155):234-243.
- Kurahashi T., Lee J., Nabeshima A., Homma T., Sil Kang E., Saito Y., ...Fujii J. (2016). Ascorbic acid prevents acetaminophen-induced hepatotoxicity in mice by ameliorating glutathione recovery and autophagy. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 604, 36-46.
- Llanos L, Contreras C, Velásquez J, Mayca J, Lecca L, Reyes R, et al. (2001). Automedicación en cinco provincias de Cajamarca. *Rev. Med Her*; 12(4):127-133.
- Ley N° 30407. Ley de Protección y Bienestar Animal. Perú. 08 de enero del 2016.

- Lock de Ugaz, O. (1993). Investigación fitoquímica - Métodos en el estudio de productos naturales. Segunda Edición. Lima-Perú
- López J, Dennis R, Moscoso S. (2009). Estudio sobre la automedicación en una localidad de Bogotá. Rev. Salud Pública; 11(3):432-442.
- López V, Akerreta S, Averó R, Calvo I. (2007); Actividad antioxidante de plantas empleadas en la medicina tradicional navarra; Revista de Fitoterapia;7(1):43-47
- Maldonado O., Jiménez E., Guapillo M., Ceballos G. y Méndez E. (2010). Radicales libres y su papel en las enfermedades crónico-degenerativas. Rev Med UV.
- Malpica A., Ticse R., Salazar M., Cheng L., Valenzuela V. y Huerta J. (2013). Mortalidad y readmisión en pacientes cirróticos hospitalizados en un hospital general de Lima, Perú. Rev. gastroenterol. Perú vol.33 (4).
- Manach C. Scalbert A. Morand C. Rémésy C. Jiménez L. (2004). Polyphenols: food sources and bioavailability. Am j clin Nutr; 79:727-747
- Mancipe L, Fernández D, y Fernández D. (2010). INTOXICACIÓN POR ACETAMINOFÉN. Rev. Fac. Med,18(2).
- Matos A, Paredes J, Gonzales L. (2010). Determinación de la capacidad antioxidante de los compuestos fenólicos del sancayo (*Corryocactus brevistylus*). Rev. Investig. Cienc. tecnol. Aliment,1(1):66-71.
- Mendoza C, El Abed Y, Márquez Y, Meléndez C, López de Ortega A y Matheus N. (2015). La Vitamina C y su Efecto Protector Hepático. Revista del colegio de médicos Veterinarios del estado Lara Barquisimeto-Venezuela. 10(2).
- Miñana J, Gómez L, Pallardo F, Del-olmo J, Escuder A. et al. (2002). Mitochondrial oxidative stress and CD95 ligand: A dual mechanism for hepatocyte apoptosis in chronic alcoholism. Hepatology, 35:1205-14.
- Ministerio de Salud. Perú. (2010). Análisis de la situación de salud del Perú. Ministerio de Salud Dirección general de epidemiología; Disponible en <http://www.slideshare.net/consultoriauniversidad/analisis-de-situacion-de-salud-del-peru-ao-2010>

- Ministerio del ambiente 2010. 101 cactus del Perú. Disponible <http://www.minam.gob.pe/diversidadbiologica/wp-content/uploads/sites/21/2014/02/cactusdelperu.pdf>
- Moreno A, González L, Mendoza-Jimenez J, Garcia-Buey L, Moreno R. (2007). Utilidad de los parámetros analíticos en el diagnóstico de las enfermedades hepáticas, 24(1).
- Murray RK, Bender DE, Botham KM, Kennelly PJ, Rodwell VW. (2010). Metabolismo de los xenobioticos, en: Murray RK. Bioquímica Ilustrada de Harper Ed. Mc Graw-Hill, 28 ed, US.
- Nolasco D y Guevara A. (2009). Estudio de las principales características fisicoquímicas y comportamiento del Sanqui (*Corryocactus brevistylus* subsp. puquiensis (Rauh & Backeberg) Ostolaza) en almacenamiento. Anales científicos UNALM, 70(4), 1-11.
- Norma General del CODEX (2005). Para zumos (jugos) y néctares de frutas. Lima-Perú.
- Okuda M, Li K, Beard M, Showalter L, Scholle F, Lemon S, et al. (2002). Mitochondrial injury, oxidative stress, and antioxidant gene expression are induced by hepatitis C virus core *protein*. *Gastroenterol*, 122(2),366-75.
- Olivares J. (2015). Efecto protector del extracto acuoso de las hojas de *Peumus boldus* “boldo” en la toxicidad hepática inducida por rifampicina en ratas holtzman hembra. (Tesis de pregrado). Universidad Nacional Mayor de San Marcos.
- Organización Mundial de la Salud (2003) DIETA, NUTRICIÓN Y PREVENCIÓN DE ENFERMEDADES CRÓNICAS Informe de una Consulta Mixta de Expertos OMS/FAO. Ginebra.
- Osorio L, Patiño T, Tagle M, Huayanay L. (2010). Percepciones, conocimientos y actitudes sobre enfermedades hepáticas en adultos sanos que acuden a instituciones de salud de estrato A, B y C. *Rev gastroenterol*, 30(21),26-132.
- Palomino M, Guija E, Lozano N. (2011). Propiedades antioxidante de la guayaba (*Psidium guajava* L.) *Rev. Soc Quim Perú*,75(2),228-234.

- Palomino M, Najarro J, Palomino C, Oriundo R, Pacheco A, Calderón S. et al. (2011). Estudio comparativo de las propiedades antioxidantes de dos ecotipos de *Corryocactus brevistylus* (Sanky). An Fac med,72(1).
- Pardo C. (2005). Ética de la Experimentación Animal. Directrices Legales y Éticas Contemporáneas: Departamento de Humanidades Biomédicas. Ediciones 3ª. Universidad de Navarra.
- Pardo O. (2002). Etnobotánica de algunas cactáceas y suculentas del Perú. Chloris Chilensis Año 5. N° 1. <http://www.chlorischile.cl>
- Peñarrieta J, Tejeda L, Mollinedo P, Vila J, Bravo J. (2014). PHENOLIC COMPOUNDS IN FOOD Rev. Bol. Quim,31(2)
- Pradhan S, Girish C. (2006). Hepatoprotective herbal drug, silymarin from experimental pharmacology to clinical medicine. Indian J Med,124,491-504.
- Ramírez M., Barajas L., Pérez C., Sáenz A., Silva S. (2012). Síntesis y actividad biológica de chalconas. Rev Mex Cienc Farm,43(4).
- Ramírez SM, Pascuzzo LC, Bastidas O. (2009). Tratamiento de intoxicación por compuestos hepatotóxicos uso de la N-acetilcisteína y las carboximetilcisteína. Arch Venez Puericultura Pediatría,72,68-72.
- Rehman1 J, Akhtar N, Khan M, Ahmad K, Ahmad M, Sultana S, Asif H. (2015). Phytochemical Screening and Hepatoprotective Effect of Alhagi maurorum Boiss (Leguminosae) Against Paracetamol-Induced Hepatotoxicity in Rabbits. Tropical Journal of Pharmaceutical Research June,14(6),1029-1034.
- Reyes-Cerecedo A., Flores-Calderón J., Villasis-Keever M., Ortiz-Galván R., Jean-Aurelus P., Cuervo-Moreno E., y col. (2017). Consenso para el manejo de la falla hepática aguda en pediatría,84(3),120-128.
- Robertson R, Harmon J, Oanh P, Poitout V. Beta (2004). Cell glucose toxicity, lipotoxicity and chronic oxidative stress in type 2 diabetes. Diabetes, 53(suppl.1):119-124.
- Roldán T, López A. (2012). Intoxicación por acetaminofén en pediatría aproximación y manejo. Univ. Méd. Bogotá,53(1),56-67.

- Rybczynska M. (1994). Biochemical aspects of free radical mediated tissue injury. *Postepy Hig Med Dows*, 48(4), 419-41.
- Saliou Cl; Rihn B, Cillard J, Okamoto T, Packer L. (1998). Selective inhibition of NF- κ B activation by the flavonoid hepatoprotector silymarin in HepG2. *FEBS Letters* 440, 8-12.
- Saller R, Brignoli R, Melzer J, Meier R. (2008). An updated systematic review with metaanalysis for the clinical evidence of silymarin. *Forsch Komplementmed*, 15(1), 9-20.
- Sandoval M, Lazarte K, Arnao I. (2008). Hepatoprotección antioxidante de la cascara y semilla de *Vitis vinífera* L. (uva). *An Fac med*, 69(4), 250-259.
- Sedlak J. Lindsay R. (1968). Estimation of Total, Protein-Bound, and Nonprotein Sulfhydryl Group in Tissue e with Ellman's Reagent. *Analytical Biochemistry*, 25, 192-205.
- Senthilkumar R, Chandran R, Parimelazhagan T. (2014). Hepatoprotective effect of *Rhodiola imbricata* rhizome against paracetamol-induced liver toxicity in rats. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 21, 409–416.
- Servicio de Farmacia, Servicio de Urgencias Generales y Servicio de Urgencias Pediátricas, Hospital General Universitario de Alicante. (2009). INTOXICACIÓN POR PARACETAMOL. Recuperado <file:///C:/Users/Equipo/Desktop/Intoxicacion%20por%20paracetamol.%202009.pdf>
- Singh H, Sidhu Sh, Chopra K, Khan M. (2016). Hepatoprotective effect of trans-Chalcone on experimentally-induced hepatic injury in rats: Inhibition of hepatic inflammation and fibrosis. *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology*, 94(8), 879-887. Doi:10.1139/cjpp-2016-0071.
- Tipoe, G.L., Leung, T.M., Liong, E., So, H., Leung, K.M., Lau, T.Y.H., et al. (2006). Inhibitors of inducible nitric oxide (NO) synthase are more effective than an NO donor in reducing carbon-tetrachloride induced acute liver injury. *Histol. Histopathol*, 21(11), 1157-1165. PMID: 16874658.

- Troncoso L, Guija E.(2007). Efecto antioxidante y hepatoprotector del *Petroselinum sativum* (perejil) en ratas, con intoxicación hepática inducida por paracetamol. An fac med,68(4), 333-343.
- Valko M, Leibfritz D, Moncol J, Cronin M, Mazur M, Telser J. (2007). Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. Int J biochem Biol,39, 44-84.
- Vargas M. (2016). Intoxicación por acetaminofén en adulto. Medicina Legal de Costa Rica, 33(1).
- Vázquez R, Reyes J, Fernández del Valle C, Anaya M, Rizzoli A. (2013). Silimarina, ácido alfa-lipoico y seleniometionina en el tratamiento de hígado graso: revisión sistemática de la literatura. An Med (Mex), 58(1), 37-46.
- William L. (2003). Drug-induced hepatotoxicity. N Engl J Med, 349, 474-85.
- Yoon E, Babar A, Choudhary M, Kutner M and Pyrsopoulos N. (2016). Acetaminophen-Induced Hepatotoxicity: A Comprehensive Update. Journal of Clinical and Translational Hepatology, 4, 131–142.
- Zapata M, Gerard L, Davies C, Schvab M. (2007). Estudio de los componentes antioxidantes y actividad antioxidante en tomates. Cienc. docencia y tecnolo, 35, 173-193.
- Zhang W, Hong R, Tian T. (2013). Silymarin's Protective Effects and Possible Mechanisms on Alcoholic Fatty Liver for Rats. Journal Biomolecules and Therapeutics, 21(4), 264-269.